

DIVERSIDAD MICROBIANA DE LAS AGUAS MINERALES TERMALES

M^a del Carmen DE LA ROSA JORGE y M^a Ángeles MOSSO ROMEO

Dpto. Microbiología II. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. Madrid.

RESUMEN

Las aguas minerales de balnearios termales presentan una gran diversidad de microorganismos autóctonos característicos de cada tipo de agua y que dependen de sus propiedades fisicoquímicas (temperatura, pH, composición). Predominan las bacterias heterótrofas oligotróficas de los géneros: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Enterobacter*, *Acinetobacter* y *Arthrobacter*. En menor número se encuentran microorganismos autótrofos (quimilitotrofos y fototrofos). También puede haber en ellas microorganismos alóctonos, procedentes de otros hábitats, considerados contaminantes, que coexisten con los anteriores, pero es rara la presencia de indicadores fecales y bacterias patógenas. En los manantiales hipertermales predominan las bacterias Gram positivas mientras que en los mesotermos son los bacilos Gram negativos y los cocos Gram positivos.

ABSTRACT

Spa mineral water shows a great diversity in its microbiota, being characteristic of each type of water due to its intrinsic physico-chemical characteristics (temperature, pH, composition). The predominant isolates are heterotrophic bacteria belonging to different genera: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Enterobacter*, *Acinetobacter* and *Arthrobacter*, although some autotrophic (chemo and phototrophic) microorganisms can also be found in a small amount. Sometimes, extraneous micro-organisms from other environments, which can be considered as contaminants, coexist with the normal microbiota, but faecal indicators or pathogenic bacteria are rare. Gram positive bacteria are the most common isolates in the hyperthermal springs, while Gram-negative rods and Gram-positive cocci in the mesothermal springs.

INTRODUCCIÓN

La diversidad de las especies que existen en un determinado hábitat es una

consecuencia de la relación entre los organismos y el ambiente, y desde un punto de vista ecológico, nos interesa conocer porqué existe esta diversidad, cómo está organizada en la comunidad microbiana y qué valor tiene para la estructura y función de toda la comunidad. Actualmente existe un gran interés por el estudio de la biodiversidad de los ambientes extremos con el fin de determinar cuáles son las características peculiares que permiten a estos microorganismos sobrevivir y qué papel tienen en los ciclos de la naturaleza. Las aguas minerales termales de los balnearios son uno de estos hábitats extremos ya que tienen altas temperaturas y elevadas concentraciones de sales, condiciones desfavorables para la vida de muchos seres vivos. Sin embargo, desde hace tiempo se conoce que estas aguas minerales, como cualquier ambiente acuático natural, poseen una población microbiana autóctona que suele ser característica de cada tipo de agua y que depende de sus propiedades fisicoquímicas (temperatura, pH, sales minerales, nutrientes). También pueden encontrarse en ellas microorganismos alóctonos, procedentes de otros hábitats (suelo, heces, vegetales), considerados contaminantes pero que coexisten con los anteriores, adaptándose a las condiciones adversas, siendo los de mayor interés sanitario *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Legionella*.

El estudio de los microorganismos del agua comenzó en el siglo XIX, siendo su principal objeto las bacterias patógenas, con el fin de controlar las enfermedades transmitidas por este medio. Los primeros estudios microbiológicos de aguas minerales, realizados en España, se remontan a 1838 cuando el farmacéutico Pablo Prolongo describe la naturaleza orgánica de los copos que flotan en las aguas del balneario de Carratraca, denominándolos *Sulfuraria carratraquense*, posteriormente, en 1882, el Dr. Eduardo Moreno realizó estudios microscópicos de las aguas de diversos balnearios, observando bacterias, “sulfurarias”, algas y hongos, teniendo el mérito de ser el impulsor de este tipo de análisis. En los años siguientes comenzaron a realizarse estudios microbiológicos más completos como el efectuado por el Dr. Santiago García Fernández en el Balneario de Arbieta (Vizcaya) en 1897, en el que además de las observaciones microscópicas incluyó recuentos y cultivos de los microorganismos, identificando algunos de ellos como *Leptothrix*, *Beggiatoa*, *Micrococcus* y *Bacillus*. Este autor indicaba ya la importancia de las investigaciones microbiológicas de las aguas como complemento indispensable de los análisis químicos por “ la necesidad de conocer las condiciones de existencia de los microorganismos saludables que habitan en las aguas medicinales, determinando las transformaciones que sufren y los orígenes de los mismos” y porque “ se precisa comprobar también que no contiene gérmenes patógenos ni capaces de producir trastornos en el organismo sano o enfermo”.

Los recientes estudios ecológicos sobre la microbiota de manantiales termales han cambiado nuestra visión de la biodiversidad microbiana y de su composición, estructura y función. En los últimos años se han descrito varios tipos de comunidades microbianas

en diferentes manantiales calientes (Ward *et al.*1998) y se han aislado un gran número de nuevas bacterias termófilas (Stetter, 1996). Estos aspectos generales se han incrementado con estudios sobre la aplicación de estos microorganismos en la biotecnología, debido a la alta resistencia al calor de sus enzimas (Por ejemplo, la polimerasa utilizada en la técnica PCR se obtuvo de una bacteria termófila, *Thermus aquaticus*). Una hipótesis muy sugestiva es que sean nuestros posibles antecesores ya que se considera que las primeras formas de vida de la Tierra hace 3 500 millones de años, fueron las bacterias hipertermófilas anaerobias (*Arqueas*) (Miller y Lazcano, 1995; Madigan *et al.* 1997).

En este trabajo pretendemos dar una visión de la gran diversidad de microorganismos que viven en las aguas minerales termales basándonos en los estudios realizados en nuestro Departamento y en colaboración con la Real Academia de Farmacia, durante casi veinte años, de diversos manantiales termales españoles que se utilizan con fines terapéuticos en Balnearios (Mosso *et al.* 1986, 1988, 1990, 1994, 1998; de la Rosa *et al.* 1983, 1987, 1989, 1991, 1993, 1995).

MICROORGANISMOS AUTÓCTONOS

La población microbiana total, en el punto de emergencia de estos manantiales, puede ser alta, con una media de 10^6 por ml, pero muchos de estos microorganismos están en estado durmiente, son metabólicamente inactivos y no se multiplican por lo que el número de los viables suele ser pequeño, de $10-10^3$ por ml, dependiendo de la temperatura de incubación y de los medios de cultivo empleados en su detección. Las bacterias autóctonas de las aguas crecen mejor en medios pobres en carbono y con tiempos de incubación prolongados. El número de bacterias esporuladas es bajo, de 10 a 10^2 por ml. Hay bacterias termófilas que crecen a más de 45°C pero la mayoría son mesófilas con temperaturas óptimas a 37°C , que se adaptan a estas condiciones de elevada temperatura. Según sus requerimientos nutricionales predominan las bacterias heterótrofas oligotróficas, con escasos requerimientos de carbono y nitrógeno (oligo-carbofilicas y oligonitrofilicas). En menor número se han encontrado microorganismos autótrofos, tanto quimiolitotrofos como fototrofos (cianobacterias, bacterias verdes y rojas). La mayoría son aerobios o anaerobios facultativos, de pequeño tamaño, móviles y con pigmentos. Las bacterias heterótrofas no suelen fermentar los azúcares pero son proteolíticas, amilolíticas, amonificantes y en menor número celulolíticas. Estos tipos de bacterias se consideran beneficiosas ya que intervienen en la autodepuración de las aguas si, de una forma accidental, sufren un aporte de materia orgánica.

En manantiales de aguas sulfurosas se encuentran bacterias que oxidan el azufre y el sulfhídrico (*Beggiatoa*, *Thermothrix*, *Thiobacillus*), así como bacterias sulfatorreductoras (*Des-*

ulfotomaculum, *Desulfovibrio*). Estas últimas se consideran perjudiciales ya que pueden producir corrosión en las conducciones de hierro debido a la producción de sulfhídrico. En aguas ferruginosas es frecuente la presencia de bacterias que oxidan el ión ferroso a férrico obteniendo energía (*Clonothrix*, *Leptothrix*, *Leucothrix*, *Sphaerotilus*). Muchas de ellas son filamentosas y producen precipitados de óxido e hidróxido férrico que pueden originar obstrucciones y biocorrosiones en las conducciones. En manantiales clorurado sódicos e hipertónicos es frecuente la presencia de bacterias halófilas moderadas (*Halomonas*, *Micrococcus*, *Vibrio*) y halotolerantes (*Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Planococcus*) que resisten una elevada osmolaridad debido a complejos mecanismos de regulación interna.

En relación con las bacterias heterótrofas, las aguas hipertermales presentan una mayor proporción de bacterias Gram positivas mientras que en las mesotermales predominan los bacilos Gram negativos y los cocos Gram positivos. La elevada temperatura de las aguas hipertermales puede ser la causa de esta diferencia ya que las bacterias Gram positivas son más resistentes al calor. Los principales géneros identificados han sido : *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Enterobacter*, *Acinetobacter* y *Arthrobacter* (Mosso *et al.* 1994). El género *Pseudomonas* es muy ubicuo y se encuentra en ambientes acuáticos con pocos nutrientes, considerando a las especies del grupo fluorescente encontradas en estas aguas, como *P. fluorescens* y *P. putida*, población autóctona de manantiales meso e hipotermales. En estas aguas con menor temperatura también es frecuente la presencia de otros bacilos Gram negativos como *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Vibrio*, *Aeromonas*. Las numerosas especies del género *Bacillus* están ampliamente distribuidas y pueden proceder del suelo o de las propias aguas. La presencia de los cocos Gram positivos, *Staphylococcus* y *Micrococcus*, es frecuente en aguas minerales ya que resisten concentraciones altas de sal, aunque no se detectan especies propias del hombre. Otros géneros de cocos presentes en estas aguas son *Vagococcus*, *Planococcus* y *Marinococcus*, típicos de ambientes acuáticos dulces y marinos. El género *Enterobacter*, a pesar de su pertenencia a la familia enterobacteriaceas, se considera que forma parte de la micropoblación autóctona ya que se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza. En ocasiones, principalmente en aguas hipertermales o carbónicas, se encuentran bacilos Gram positivos irregulares como *Arthrobacter*, *Kurthia*, *Corynebacterium*, *Cellulomonas*, *Exiguobacterium*, *Rubrobacter*, y otros difíciles de identificar, cuyo hábitat puede ser el suelo pero que se han adaptado a vivir en condiciones adversas.

MICROORGANISMOS ALÓCTONOS

Desde un punto de vista sanitario, las aguas termales no suelen tener bacterias patógenas ni indicadores fecales pero en algunos manantiales se han detectado coliformes, enterococos, *Clostridium* sulfito reductores y *Pseudomonas aeruginosa*. La presencia de coliformes

no fecales no es un riesgo sanitario ya que pueden proceder del suelo o de los vegetales y sobreviven en ambientes acuáticos por su facilidad de adaptación formando "biofilms" (Lechevalier *et al.* 1987). Por otro lado existe controversia para considerar a los enterococos y *Clostridium* sulfito reductores indicadores de una contaminación fecal cuando aparecen ocasionalmente como único indicador, debido a su mayor supervivencia ya que se han encontrado en ambientes donde no ha habido aporte fecal por lo que en aguas poco contaminadas, como los manantiales minerales, se recomienda utilizar varios indicadores, siendo *Escherichia coli* el más significativo. La presencia de *P. aeruginosa* en estas aguas minero-medicinales no es deseable ya que es un patógeno oportunista y puede producir infecciones en personas inmunodeprimidas. Su presencia puede indicar una escasa protección del manantial aunque puede colonizar ambientes acuáticos y encontrarse en aguas subterráneas no contaminadas por el hombre (Leclerc y Mossel, 1989).

En cuanto a los microorganismos eucariotas se han encontrado en escasa proporción, algas y hongos, principalmente mohos de los géneros: *Penicillium*, *Aspergillus* y *Alternaria*. Estos géneros se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y no afectan a la calidad sanitaria de las aguas cuando se encuentran en número bajo.

CONCLUSIÓN

Los manantiales termales estudiados poseen una gran diversidad microbiana aunque no es específica de cada uno de ellos. Sin embargo, se observa una cierta relación entre algunos microorganismos y las aguas con características fisicoquímicas más extremas de pH, temperatura, salinidad y radiactividad. Los manantiales con pH alcalino tienen poca diversidad microbiana, encontrándose *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Exiguobacterium* que pueden vivir a estos pH y los de pH ácido presentan un número de bacterias muy pequeño, principalmente bacilos Gram positivos irregulares. En los manantiales hipertermales predominan las bacterias Gram positivas y en los hipertónicos, con alto contenido en cloruro sódico, abundan los microorganismos halófilos moderados. Los manantiales carbónicos presentan mayor proporción de bacterias anaerobias facultativas que aerobias estrictas ya que la cantidad de oxígeno disuelto es bajo y en algunos manantiales radiactivos se ha aislado *Rubrobacter radiotolerans*, una bacteria radiotolerante (Suzuki *et al.* 1988).

BIBLIOGRAFÍA

- PROLONGO, P. 1874. Historia de las capas de azufre que salen mezcladas con las aguas del manantial de Carratraca (Sulfuraria Carratraquense). *Actas Soc. Malagueña Ciencias Físicas y Naturales*. I, 67-69.
- MORENO, E. 1882. Importancia de la microscopía en el estudio de las aguas minero-medicinales. *An. Soc.*

Esp. Hidrol. Med. IV.nº 24.

- GARCÍA FERNÁNDEZ, S. 1897. Análisis microbiológico de las aguas del Balneario de Arbieta, Orduña (Vizcaya). *Est. tipográfico sucesores de Rivadeneyra*. Madrid.
- WARD D. FERRIS, M. NOLD, S. AND BATESON, M. 1998. A natural view of microbial biodiversity within hot spring cyanobacterial mat communities. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 4, 1353-1370.
- STETTER, K.O. 1996. Hyperthermophilic procaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* 18, 149-158.
- MILLER, S. L. Y LAZCANO A. 1995. The origin of life: did it occur at high temperatures?. *J. Mol. Evol.* 41, 689-692.
- MADIGAN, M., MARTINKO, J. Y PARKER, J. 1997. Brock. Biología de los microorganismos. *Ed. Prentice Hall*. Madrid.
- MOSSO, M.A., DÍAZ, F. Y DE LA ROSA, M.C. 1986. Microbiología de las aguas minero-medicinales de Archena. Memoria nº 12. *Ed. Real Acad. Farmacia*. Madrid.
- MOSSO, M.A. DE LA ROSA, M.C. Y DÍAZ, F. 1988. Microbiología del manantial de aguas minero-medicinales y de los lodos del balneario de Arnedillo. Memoria nº 14. *Ed. Real Acad. Farmacia*. Madrid.
- MOSSO, M.A. DE LA ROSA, M.C., VIVAR, C. Y MEDINA, R. 1990. Microbiología del manantial de aguas minero-medicinales de Alange. Memoria nº 16. *Ed. Real Acad. Farmacia*. Madrid.
- MOSSO, M.A. DE LA ROSA, M.C., VIVAR, C. ARROYO, G. Y DÍAZ, F. 1994. Microbiología de las aguas minero- medicinales del manantial del balneario de Lugo. Memoria nº 20. *Ed. Real Acad. Farmacia*. Madrid.
- MOSSO, M.A., M.C. DE LA ROSA Y M.C. VIVAR. 1998. Microbiología del manantial Hervideros del Balneario de Cofrentes. *An. Real Acad. Farm.* 64. Nº extr. 53-63.
- ROSA, M.C. DE LA, DÍAZ, F., MOSSO, M. A. Y GASTÓN DE IRIARTE, E. 1983. Microbiología de las aguas minero-medicinales de Alhama de Aragón. *An. Real Acad. Farm.* 49: 381-388.
- ROSA, M.C. DE LA, MOSSO, M.A., DÍAZ, F., CASTELLANOS, J.A. Y GARCÍA ARRIBAS, M.L. 1987. Microbiología de los manantiales de aguas minero-medicinales del Balneario de Fortuna. Memoria nº 13. *Ed. Real Acad. Farmacia*. Madrid.
- ROSA, M.C. DE LA, MOSSO, M.A., DÍAZ, F. Y VIVAR, C. 1989. Microbiología de los manantiales de aguas minero-medicinales del balneario de Caldas de Bohí. Memoria nº 15. *Ed. Real Acad. Farmacia*. Madrid.
- ROSA, M.C. DE LA, MOSSO, M.A., DÍAZ, F. VIVAR, C. Y MEDINA, M.R. 1991. Microbiología de los manantiales de aguas minero-medicinales de Fitero. Memoria nº 18. *Ed. Real Acad. Farmacia*. Madrid.
- ROSA, M.C. DE LA, MOSSO, M.A., VIVAR, C., MEDINA, M.R., ARROYO, G. Y DÍAZ, F. 1993. Microbiología de las aguas minero-medicinales del Balneario de La Toja. Memoria nº19. *Ed. Real Acad. Farmacia*. Madrid.
- ROSA, M.C. DE LA, MOSSO, M.A., VIVAR, C. Y ARROYO, G. 1995. Microbiología de las aguas minero-medicinales del Balneario de Blancafort. Memoria nº 21. *Ed. Real Acad. Farmacia*. Madrid.
- MOSSO, M.A., DE LA ROSA, M.C., VIVAR, C. AND MEDINA, M.R. 1994. Heterotrophic bacterial populations in the mineral waters of thermal springs in Spain *J. App. Bacteriol.* 77: 370-381.
- LECHEVALIER, M. BABCOCK, T. AND LEE, R. 1987. Examination and characterization of distribution the biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 2714-2724.