

# “Microscopia Electrónica Analítica del material orgánico de las aguas sulfuradas”

Francisco MARAVER EYZAGUIRRE\*, Vicente CRESPO FERRER\*\*  
María del Carmen SANCHEZ-QUEVEDO\*\*\* y Antonio CAMPOS MUÑOZ\*\*\*\*  
Josefina SAN MARTIN BACAICOA\*\*\*\*\*

## RESUMEN

Se estudian morfológica y microanalíticamente las aguas sulfuradas de «Montemayor» mediante un M.E.B. Philips 505, provisto de un sistema de energía dispersiva de Rayos X Edax PV 9100 - versión 2.3. Se han observado asociaciones entre las formaciones esféricas u ovoides y las estructuras cilíndrico-filamentosas, y las características físico-químicas expresadas en el estudio microanalítico.

## RÉSUMÉ

On étudie les eaux sulfurées de «Montemayor» du point de vue morphologique et micro-analytique par le moyen du M.E.B. Philips 505, lequel est pourvu d'un système d'énergie dispersif de Rayon X Edax PV 9100 - version 2.3. On a observé des associations entre les formations sphériques ou ovoides et les structures cylindrico-filamenteuses et les caractéristiques physico-chimiques exprimées dans l'étude micro-analytique.

## SUMMARY

Sulfur mineral waters of «Baños de Montemayor» have been morphologic and microanalytical studied by using a S.E.M. Philips 505, supplied with an energy scattering System of X-Ray Edax PV 9100 2.3. Some the ovoid and filament formations observed are concertates with the physico-chemical and microanalytical study.

## Introducción

El microanálisis propuesto por COSTAING (6) en 1951 es, según PANESSA (18), una técnica analítica «no destructiva» que permite conocer en un corto período de tiempo —segundos— «in situ», la morfología y la composición química que la integra. Las bases teóricas de la técnica microanalítica han sido estudiadas recientemente

te en profundidad tanto en su vertiente física (HEINRICH) (13) como en su aplicabilidad biológica (HUTCHISON) (14).

La aplicación no sólo a muestras biológicas sólidas sino a especímenes líquidos y semilíquidos ha abierto las puertas de esta importantísima rama de la biotecnología al estudio de las aguas minero-medicinales. Esta técnica resulta del mayor interés en el caso de las aguas sulfuradas que como destacan todos los tratados modernos de Hidrología Médica AMELUNG (1), ARMIJO (2), BERT (3), GUALTIEROTTI (12), MESINI (17), etc., contienen, en proporciones muy variables, materia orgánica que integran la denominada «sulfuraria» o «glairina-baregina» de los franceses.

El objeto del presente trabajo es estudiar morfológica y microanalíticamente que energía dispersiva de rayos X emergen de la flora autótrofa de las aguas sulfuradas, y para este fin hemos utilizado las aguas de Baños de Montemayor.

## Material y método

El material utilizado para el presente estudio fue obtenido del rebosadero del manantial «Arqueta», de aguas sulfuradas-bicarbonatadas-sódicas que emergen a 42° C de temperatura, siguiendo las recomendaciones oficiales establecidas a este fin (4). Su aspecto de lodo blanquecino, gelatinoso y consistente, se correspondía con las características típicas macroscópicas del material orgánico de estas aguas. La cantidad utilizada para este estudio fueron 125 cc.

Para el estudio morfológico, las muestras —5— fueron fijadas utilizando la técnica de inmersión en glutaraldehído al 3,5 % en tampón forfato, con un pH = 7,4 y temperatura de 4° C, durante un tiempo máximo de 24 horas. Como postfijador, utilizamos tetróxido de osmio al 2 % en tampón fosfato durante una hora. La deshidratación la realizamos en acetona creciente, realizándose el punto crítico con CO con el objeto de conseguir la desecación absoluta de las muestras. Posteriormente las muestras fueron montadas en portapreparaciones de aluminio, utilizando como adherente plata coloidal, y fueron recubiertas, finalmente, con oro en un sputtering Polaron E-5000.

\* Prof. Titular Int. de Hidrología Médica. Fac. Medicina. Madrid.

\*\* Prof. Titular de Histología. Fac. Medicina. Granada.

\*\*\* Colaborador de la Cátedra de Histología. Fac. Medicina. Granada.

\*\*\*\* Catedrático de Histología. Fac. Medicina. Granada.

\*\*\*\*\* Catedrático de Hidrología Médica. Univ. Complutense.

Para el estudio microanalítico, las muestras —5— fueron fijadas en N<sub>2</sub> líquido a —190° C y montadas en porta preparaciones de grafito. La deshidratación y el secado lo realizamos en un «Freeze-dried» Polaron E-5003 a —50° C durante 48 horas, con el objeto de impedir la redistribución iónica de los elementos químicos, finalmente fueron recubiertos con carbón.

Para la observación, tanto morfológica como microanalítica, hemos utilizado un M.E.B. Philips 505 provisto de un sistema de energía dispersiva de rayos X Edax PV 9100 versión 2.3.

Para el estudio microanalítico utilizamos las siguientes constantes:

- Spot size de 50 manómetros.
- Aumentos de 700.
- Angulación de superficie, 35°
- Angulación de percepción, 51,84°
- Superficie de análisis, 165 micras cuadradas
- Tiempo de acumulación de 50 segundos.

Bajo estas condiciones se obtuvieron una serie de gráficas espectrales de cada una de las 10 mediciones analizadas (2 por cada muestra), que delimitaban los elementos existentes.

Obtenido el espectro de energía dispersiva de Rayos X, en el cual se identificaban los elementos contenidos más significativos (Na, Mg, P, S, Ca, Cu, Mn, Fe, Zn), posteriormente, conseguimos en cada uno el número exacto

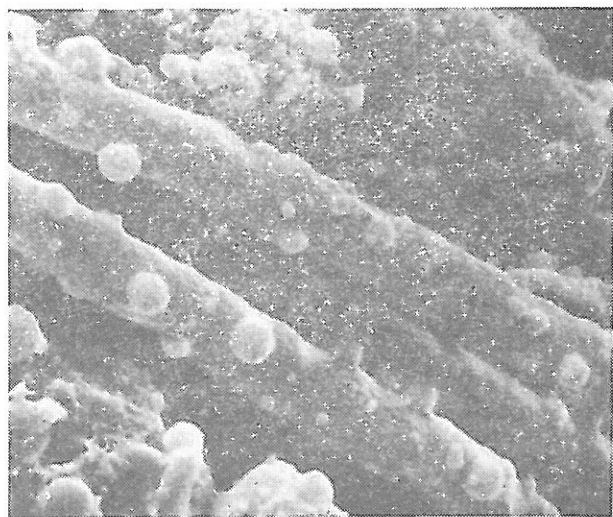


Fig. 1

En segundo lugar, y microanalíticamente, los resultados obtenidos del estudio de la flora autótrofa de las aguas sulfuradas de Montemayor se señalan en la tabla I, en la que indicamos los valores medios obtenidos en las diez mediciones realizadas, expresados en la relación P/B (Pico/fondo). Es significativo resaltar, en este sentido, los valores alcanzados por los elementos azufre (S = 4,937), sodio (Na = 2,825) y calcio (Ca = 1,635). Tras la aplicación de la corrección del ZAF para el tratamiento de dichos resultados con el objeto de obtener una relación semicuantitativa de los mismos, observamos que el elemento azufre presenta un valor máximo de 43,88 %, siendo el sodio de 31,56 % y el calcio de 14,60 % (tabla I).

de cuentas de cada elemento analizado y la relación P/B (pico/fondo) con la intención de poder aplicar más adelante este último factor para la realización de un análisis semicuantitativo que relacionase a todos los elementos existentes en la muestra de estudio.

Para el análisis semicuantitativo tuvimos en cuenta la correlación del ZAF, que elimina el efecto de fluorescencia, así como el número atómico y el factor de absorción, para evitar la generación de elementos artefactuales.

## Resultados

En estas aguas sulfuradas se observa, en primer lugar, desde un punto de vista morfológico, una abundante presencia de unas formaciones cilíndrico-filamentosas de aproximadamente una micra de diámetro, las cuales se asocian generalmente constituyendo un patrón reticular típico (fig. 1). Asimismo, destaca la existencia sobre la superficie de estos elementos filamentosos de unas formaciones esferoidales u ovoides estrechamente asociadas a los mismos, con un tamaño de alrededor de media micra de diámetro. Dichas formaciones presentan una superficie granular sumamente característica (fig. 2).

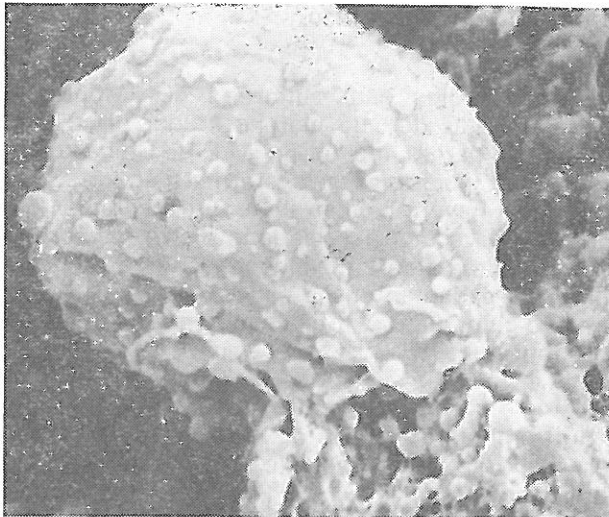


Fig. 2

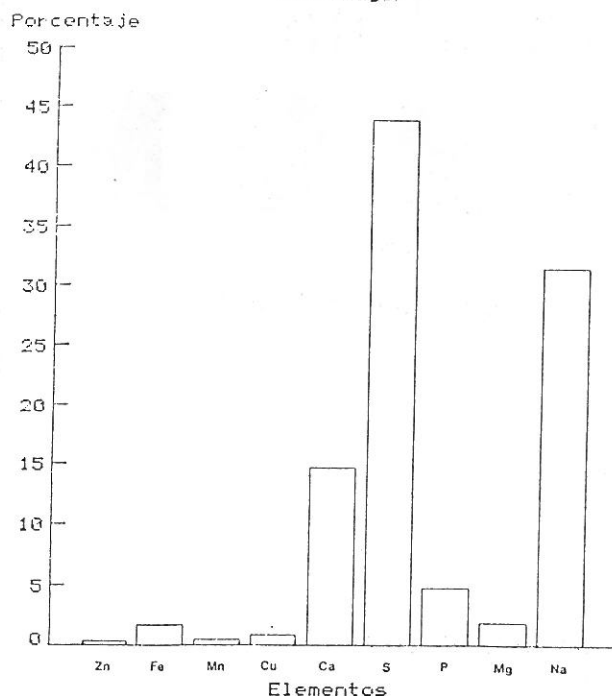
Elementos	Orbital	X P/P	%
Na	K $\alpha$	2,825	31,56
Mg	K $\alpha$	0,148	1,88
P	K $\alpha$	0,522	4,74
S	K $\alpha$	4,937	43,88
Ca	K $\alpha$	1,635	14,60
Cu	K $\alpha$	0,086	0,83
Mn	K $\alpha$	0,051	0,49
Fe	K $\alpha$	0,179	1,68
Zn	K $\alpha$	0,360	0,35

Tabla I

## Discusión

Como hemos descrito en los resultados, la flora autótrofa de las aguas sulfuradas de Baños de Montemayor, destacan morfológicamente por la existencia de unas formaciones cilíndrico-filamentosas que parecen ser compatibles, como

Microanálisis flora autotrofa (2)  
Montemayor



señala TORRELLA (19), con *Tricomonas* procarrióticas, que pueden más concretamente pertenecer al grupo de las *Beggiatoas*, las cuales son frecuentes en este tipo de aguas. Este dato además queda corroborado, con el estudio microanalítico realizado que revela asimismo una presencia elevada en el porcentaje del azufre (43,88 %).

Hemos de señalar, por otra parte, que como indica ENGEL (10), el nivel de glicosamino-glicanos y proteoglicanos puede relacionarse microanalíticamente con los valores de azufre. Es de resaltar, en este sentido, que aunque la función de los proteoglicanos y glicosamino-glicanos ha sido objeto de amplios estudios (5, 11), y parece clara su participación en los procesos de mineralización, el papel exacto que desempeñan resulta todavía hoy como indica GOLDBERG (10) bastante desconocidos.

En relación con las formaciones esféricas u ovoides que se observan fundamentalmente en la superficie de estos filamentos, hemos de decir, que aunque puedan corresponder a bacterias epifitas, también es posible que dichas formaciones correspondan a nódulos microcristalinos de carbonato cálcico. A este respecto, el estudio microanalítico realizado a estas aguas revela un nivel significativo de calcio en las mismas (14,60 %).

La asociación observada, en nuestro estudio, entre las formaciones esféricas u ovoides y las estructuras cilíndrico-filamentosas puede explicarse en relación con las características fisi-

co-químicas expresadas mediante el estudio microanalítico.

En este sentido, los agregados monomoleculares cargados negativamente (KLEIN) (15), (ENGEL) (7) parecen jugar un papel importante en relación con la fijación del calcio. De acuerdo con ENGL (9) y LI (16), los grupos aniónicos de los complejos carbohidratos-proteínas y los grupos sulfatos o carboxilos son compuestos que poseen estas propiedades eléctricas y, como es obvio, forman parte de las estructuras cilíndrico-filamentosas.

La interrelación entre el calcio y estos agregados monomoleculares cargados negativamente resulta poco clara y posee, según ENGEL (9) un carácter básicamente especulativo. Se postulan, según dicho autor, sin embargo, dos probables reacciones: la formación de complejos fijadores de calcio y las condiciones del equilibrio de GIBBS-DONNAN (ENGEL) (7,8).

#### BIBLIOGRAFIA

1. AMELUNG, W., y HILDEBRAN, G. (1985) «*Balneologie und medizinische Klimatologie*». Springer-Verlag. Berlín.
2. ARMIJO, M. (1968) «*Compendio de Hidrología Médica*». Ed. Científico-Médica. Barcelona.
3. BERT, J. M.; BESANCON, F, y cols. (1972) «*Thérapeutique Thermale et Climatique*». Ed. Masson et Cie. París.
4. B.O.E., Núm. 17, 20 de enero de 1982. 1275-1281.
5. BUCKWALTER, J. A. (1983) «*Proteoglycan structure in calcifying cartilage*». Clin. Orthop., 172: 207-232.
6. CASTAING, R. (1951) «*Applications des sondes électroniques a une methode d'analyse ponctuelle chimique et cristallographique*». These Doctoral d'Etat. Onera ed. París.
7. ENGEL, M. B.; JOSEPH, N. R., y CATCHPOLE, H. R. (1954) «*Homeostasis of connective tissues. Calcium-sodium equilibrium*». Arch. Pathol., 58: 26-39.
8. ENGEL, M. B., JOSEPH, N. R.; CATCHPOLE, H. R., y LASKIN, D. N. (1960) «*A Theory of connective tissue behavior*». Ann. N.Y. Acad. Sci., 85: 399-420.
9. ENGEL, M. B., y HILDING, O. H. (1984) «*Mineralization of developing teeth*». Scan. Electron. Microscopy., 4: 713-723.
10. GOLDBERG, M., y SEPTIER, D. (1986) «*Ultrastructural location of complex carbohydrates in developing rat incision charnel*». Anatomical. Record., 216: 181-190.
11. GROVER, W. B., y SHOSHAN, S. (1980) «*Three-dimensional organization of collagen fibers in tendon*». Tissue Cell., 12: 523-528.
12. GUATIEROTTI, R. (1981) «*Medicina Termale*». Lucisano Ed. Milano.
13. HEINRICH, K. (1981) «*Electron beam x-ray microanalysis*». Van Nostrand. Reinhol N.Y.
14. HUTCHINSON, T. E., y SOMLYO, A. P. (1981) «*Microprobe Analysis of biological systems*». Academia Press. N.Y., 3-228.
15. KLEIN, H., y AMBERSON, W. R. (1979) «*A Physicochemical study of dental charnel*». J. dent. Res., 9: 667-688.
16. LI, S. T., y KATZ, E. P. (1977) «*On the state of anionic groups of demineralized matrices of bone and dentine*». Calc. Tiss. Press., 22: 275-284.
17. MESSINI, M. (1951) «*Trattato di Idroclimatologia Clinica*». Ed. Capelli. Bologna.
18. PANESSA, B. J. (1983) «*Basic biological x-ray microanalysis*». Scan. Electron. Microscopy., 4: 713-723.
19. TORRELLA, F. (1986) (Comunicación personal).