



ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUIMICA Y FARMACIA

**“ESTUDIO MICROBIOLÓGICO DE LAS TERMAS DE LA
VIRGEN UBICADO EN LA PARROQUIA MATRIZ
PERTENECIENTE AL CANTÓN BAÑOS DE AGUA
SANTA-TUNGURAHUA”**

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIA A LA OBTENCION DEL TÍTULO DE
BIOQUÍMICO FARMACEÚTICO**

AUTOR: ARTURO JAVIER SORIA PEÑAFIEL

TUTOR: Dr. FELIX ANDUELA LEAL

RIOBAMBA - ECUADOR

2015

ESCUELA SUPERIOR POLITECICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUIMICA Y FARMACIA

El tribunal del trabajo de Titulación certifica que; El trabajo de investigación científica: **“ESTUDIO MICROBIOLÓGICO DE LAS TERMAS DE LA VIRGEN UBICADO EN LA PARROQUIA MATRIZ PERTENECIENTE AL CANTÓN BAÑOS DE AGUA SANTA-TUNGURAHUA”**, de responsabilidad del señor egresado Arturo Javier Soria Peñafiel, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de trabajo de titulación, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Dr. Félix Andueza Leal.

**DIRECTOR TRABAJO
DE TITULACIÓN**

Dra. Sandra Escobar

MIEMBRO DE TRIBUNAL

NOTA DEL TRABAJO

DE TITULACIÓN

HOJA DE RESPONSABILIDAD

Yo, Arturo Javier Soria Peñafiel, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en este Trabajo de Titulación; y el patrimonio intelectual del mismo, pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DE CHIMBORAZO.

Arturo Javier Soria Peñafiel

DEDICATORIA

Dedico este trabajo de titulación a Dios, por cuidarme siempre en cada paso de mi vida, brindándome fortaleza y sapiencia para poder sobrellevar cada reto que día a día se presentan en mí vivir. A mis queridos padres José y Marianita, por todos sus consejos y apoyo incondicional, quienes han velado por mi bienestar desde el momento en que Dios me dio vida. Formándome como persona con buenos sentimientos, hábitos y valores, lo que me ayudó a superar los momentos más difíciles. Gracias a ellos soy quien hasta ahora lo soy. De corazón los quiero más que a mi vida. A mis hermanos por sus enseñanzas, por compartir sus sabias experiencias y entender que cada uno a su manera llega a triunfar sin importar las dificultades del camino a seguir.

A mis amigos y compañeros por enseñarme valores como la humildad y compañerismo. Por compartir gratos y desagradables momentos durante la vida universitaria...

Arturo J. Soria P.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por darme salud, sabiduría, valor, fuerza, y paciencia para saber sobresalir de cada dificultad y llegar a concluir mis estudios universitarios.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por brindarnos su infraestructura, servicios y personal docente quienes permiten enriquecer nuestros conocimientos académicos, aptitudes y destrezas necesarias para ejercer nuestra profesión y así ser útil para la sociedad.

Al Dr. Félix Andueza Leal por su valioso aporte con sus grandes conocimientos y tutoría en la ejecución de la presente investigación.

A la Dra. Sandra Escobar por su generosidad, asesoramiento y colaboración con sus conocimientos teórico-prácticos en la concepción de este proyecto.

A todas las personas que de una u otra manera apoyaron en la ejecución de este trabajo investigativo.

Arturo J. Soria P.

ÍNDICE GENERAL

LISTA DE CUADROS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE GRAFICAS

RESUMEN

SUMARY

INTRODUCCION

CAPITULO I

1.	MARCO TEORICO	1
1.1.	El agua	1
1.1.1.	<i>Agua natural</i>	1
1.1.2.	<i>Agua minero termales</i>	1
1.1.2.1.	<i>Sales presentes en aguas termales</i>	2
1.1.2.2.	<i>Origen de las aguas minero termales</i>	2
1.1.2.3.	<i>Fuentes termales</i>	4
1.1.2.4.	<i>Mecanismos de surgencia de aguas termales</i>	5
1.1.2.5.	<i>Origen del flujo calórico</i>	6
1.1.2.6.	<i>Clasificación de las aguas termales</i>	7
1.1.2.7.	<i>Ambientes geotermales</i>	11
1.2.	Microbiología	15
1.2.1.	<i>Microorganismos de ambientes extremos</i>	15
1.2.2.	<i>Clasificación de microorganismos extremófilos</i>	15
1.2.3.	<i>Microorganismos termófilos</i>	16
1.2.3.1.	<i>Generalidades</i>	16
1.2.3.2.	<i>Hábitat</i>	18
1.2.3.3.	<i>Taxonomía</i>	19
1.2.3.4.	<i>Metabolismo de microorganismos termófilos anaerobios</i>	20
1.2.3.5.	<i>Mecanismos de supervivencia a altas temperaturas</i>	22
1.3.	Cantón Baños De Agua Santa	25
1.3.1.	<i>Datos Generales</i>	25
1.3.2.	<i>Antecedentes Geográficos</i>	25
1.3.3.	<i>Inventario de Atractivos Turísticos</i>	26
1.3.4.	<i>Fuentes Termominerales de la Virgen</i>	26

CAPITULO II		
2.	METODOLOGIA	29
2.1.	Toma de muestra	29
2.1.1.	<i>Tipo de Muestras</i>	29
2.1.2.	<i>Cantidad de Muestra</i>	29
2.1.3.	<i>Preparación del muestreo</i>	30
2.1.4.	<i>Selección de envases</i>	30
2.1.5.	<i>Condiciones de conservación para cada parámetro a analizar</i>	32
2.1.6.	<i>Obtención de la muestra</i>	33
2.2.	Pruebas in Situ	33
2.3.	Placas Petrifilm	33
2.3.1.	<i>Siembra en Petrifilm, repique y aislamiento de colonias puras en Müller Hilton</i>	34
2.3.2.	<i>Placas Petrifilm para recuento de coliformes</i>	34
2.3.3.	<i>Placas Petrifilm para recuento de Staphylococcus aureus</i>	34
2.3.4.	<i>Placas Petrifilm para recuento de Aerobios</i>	35
2.3.5.	<i>Placas Petrifilm para recuento de Levaduras y Mohos</i>	35
2.4.	Pruebas ; Catalasa Y Oxidasa	35
2.5.	Tinción Gram	36
2.6.	Pruebas; movilidad (MIO) y oxido/fermentación (O/F)	36
2.7.	Pruebas de hidrolisis: almidón y gelatina	38
2.8.	Pruebas confirmatorias	39
2.8.1.	<i>Crecimiento en agar manitol salado</i>	39
2.8.2.	<i>Pruebas bioquímicas de diferenciación de enterobacterias</i>	40
 CAPITULO III		
RESULTADOS Y DISCUSIONES		45
3.1.	Análisis, interpretación y discusión de resultados	45
3.2.	Pruebas de Hipótesis	53
3.3.	Presentación de Resultados	53
3.3.1.	<i>Pruebas In Situ del balneario de las termas “La Virgen”</i>	53
3.3.2.	<i>Recuento de Aerobios Mesófilos (RAM)</i>	54
3.3.3.	<i>Recuento de Coliformes Totales y Fecales*</i>	54
3.3.4.	<i>Recuento de Staphylococcus</i>	55
3.3.5.	<i>Recuento de Mohos y Levaduras</i>	56
3.3.6.	<i>Numero de bacterias Gram positivas y Gram negativas aisladas</i>	57
3.3.7.	<i>Bacterias Gram positivas y sus características microbiológicas</i>	58

3.3.8.	<i>Bacterias Gram negativas y sus características microbiológicas</i>	58
3.3.9.	<i>Bacterias identificadas y sus características microbiológicas</i>	60

CONCLUSIONES

RECOMENDACIONES

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ANEXOS

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1-1.	Clasificación de microorganismos extremófilos	15
Cuadro 2-1.	Características generales de los microorganismos termófilos	17
Cuadro 3-1.	Fuente de microorganismos que dan enzimas termolábiles	18
Cuadro 4-1.	Reacciones productoras de energía en M. Termofílicos	21
Cuadro 5-1.	Clasificación de las Extremoenzimas	24
Cuadro 6-1.	Inventario de lugares turísticos de Baños de Agua Santa	26
Cuadro 7-1.	Información general de la terma “Virgen 1”	27
Cuadro 8-1.	Balance iónico y propiedades físicas de las termas “La Virgen”	28
Cuadro 9-2.	Tipo de material de envase para recolectar muestras	31
Cuadro 10-2.	Condiciones de almacenamiento de muestras	32
Cuadro 11-2.	Composición del agar de movilidad	37
Cuadro 12-2.	Composición del medio básico Hugh Leifson	37
Cuadro 13-2.	Composición agar Almidón	38
Cuadro 14-2.	Composición medio Gelatina	39
Cuadro 15-2.	Composición medio agar Manitol Salado	39
Cuadro 16-2.	Composición medio agar Kliger Hierro	40
Cuadro 17-2.	Composición medio agar Citrato Simmons	41
Cuadro 18-2.	Composición medio agar SIM	42
Cuadro 19-2.	Interpretación de resultados agar SIM	42
Cuadro 20-2.	Formulación del medio Christensen	43
Cuadro 21-3.	Pruebas in Situ de las termas “La Virgen”	53
Cuadro 22-3.	RAM de las termas de “La Virgen”	54
Cuadro 23-3.	Recuento de Coliformes totales y fecales (*)	54
Cuadro 24-3.	Contaje de <i>Staphylococcus</i>	55
Cuadro 25-3.	Cuantificación e interpretación de colonias en Staph Express.	56
Cuadro 26-3.	Contaje de Levaduras y Mohos (*)	56
Cuadro 27-3.	Contaje de Bacterias Gram Positivas y Gram Negativas	57
Cuadro 28-3.	Características microbiológicas de las B. Gram Positivas	58
Cuadro 29-3.	Características microbiológicas de las B. Gram Negativas	58
Cuadro 30-3.	Características oxido/fermentativas de las B. Gram Negativas	59
Cuadro 31-3.	Características de Bacilos identificados	60
Cuadro 32-3.	Pruebas bioquímicas confirmatorias para enterobacterias	61
Cuadro 33-3.	Características de Cocos identificados	61

LISTA DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1-1.	Bosquejo del origen geotérmico de las aguas termales	3
Ilustración 2-1.	Bosquejo del origen mixto de las aguas termales	4
Ilustración 3-1.	Estructuras de los microorganismos termófilos	23
Ilustración 4-1.	Geología y ubicación de las termas “La Virgen”	27
Ilustración 5-1.	Fuentes de “La Virgen”	28
Ilustración 6-2.	Esquema para el aislamiento de colonias puras	44
Ilustración 7-2.	Esquema para la identificación y diferenciación de bacterias	44

LISTA DE GRAFICAS

Gráfica 1-3.	RAM de las termas “La Virgen”	54
Gráfica 2-3.	Recuento de Coliformes Totales	55
Gráfica 3-3.	Recuento de Coliformes Totales y Fecales	55
Gráfica 4-3.	Recuento de <i>Staphylococcus</i>	56
Gráfica 5-3.	Cuantificación de hongos	57
Gráfica 6-3.	Cuantificación de Bacterias Gram Positivas y Gram Negativas	57
Gráfica 7-3.	Cuantificación en base en P. Oxidasa de Bacterias Gram Positivas	58
Gráfica 8-3.	Cuantificación de la producción de gas en B. Gran Negativas	59
Gráfica 9-3.	Cuantificación de microorganismos identificados	62

RESUMEN.

Las aguas termales son un recurso natural que se ha utilizado desde épocas remotas como un medicamento para curar ciertas dolencias, sin embargo, en los países latinoamericanos poco es la importancia que se ha dado como paliativo en el tratamiento de las enfermedades. Los diversos estudios realizados en el Ecuador, se refieren a las propiedades fisicoquímicas, dejando de lado el estudio de características microbiológicas. Por lo señalado anteriormente se propuso el presente trabajo cuyo objetivo fue conocer la calidad microbiana de las aguas termales de “La Virgen” del Cantón Baños de Agua Santa en la Provincia de Tungurahua.

Para realizar los estudios microbiológicos se tomaron muestras del tipo selectivas en profundidad y se utilizaron métodos de siembra, cultivos y aislamiento recomendados por la APHA (2005) y la AOAC (2003), empleando métodos de cultivos específicos para cada uno de los grupos bacterianos estudiados así como también pruebas bioquímicas para la identificación de las micro especies presentes (MAC FALDDIN, 2004, APHI, 2000). Para el análisis de resultados se obtuvieron media, varianza y desviación estándar logrando determinar que en el ojo de agua existen microorganismos en concentraciones mínimas (8 UFC/mL), por el contrario en la piscina la concentración aumenta considerablemente (164 UFC/mL).

Se determinó que estas termas son Hipertermales y tienen una microbiota autóctona escasa correspondiente a microorganismos del género *Bacillus coagulans* mientras que en la piscina del balneario hay una microbiota alóctona caracterizada por *Chryseomona luteola*, *E. coli*, *S. aureus* y *S. saccharolyticus*.

Se concluyó que el balneario contiene una microbiota potencialmente patógena, debido al elevado número de bañistas y a un indebido saneamiento y desinfección de toda la infraestructura que facilita la proliferación de microorganismos.

Se recomienda al GAD de Baños de Agua Santa ampliar este estudio con muestreos constantes en cada parte de las instalaciones para así mejorar la calidad sanitaria del agua y por ende que los bañistas encuentren los beneficios esperados para su salud.

Palabras clave: < CULTIVO > < PATÓGENA > < BACTERIA > < CALIDAD SANITARIA >
< CONCENTRACION > < MICROBIOTA ALÓCTONA > < MICROBIOTA AUTÓCTONA >
< CALIDAD MICROBIANA > < MUSTREO > <BAÑOS DE AGUA SANTA> < AGUAS HIPERTERMALES DE LA VIRGEN >

ABSTRACT

The hot springs are a natural resource that has been used since ancient times as a medicine to cure certain ailments, however, Latin American countries little is the importance that has been given as palliative in the treatment of diseases. The various studies conducted in Ecuador, refer to physico-chemical properties, leaving aside the study of microbiological characteristic. By the designated previously proposed this study whose objective was to determine the microbial quality of the thermal waters of “Virgin” of the Canton Baños de Agua Santa in the province of Tungurahua.

To perform microbiological studies selective in-depth type samples and used methods of sowing, crop and insulation recommended by the APHA (2005) and the AOAC (2013), using methods of crop-specific for each of the studies bacterial groups as well as also tests for the identification of obtained average, variance and deviation standard managing to determine that there are microorganisms in the water eye in minimal concentrations ((UFC/mL), on the contrary in the pool the concentration increases considerably (164 UFC/mL).

It was determined that these springs are Hipertermales and have a micro little native biota for microorganisms of the genus *Bacillus coagulans* while that in the spa pool is a micro alien biota characterized by *Chryseomona luteola*, *E. coli*, *S. aureus* and *S. saccharolyticus*.

It was concluded that the spa contains a micro biota potentially pathogenic, due to the high number of bathers and improper sanitation and disinfection of the entire infrastructure that facilitates the proliferation of microorganisms.

It was recommended that Baños de Agua Santa GAD extend this study with surveys in every part of the premises to improve the sanitary quality of water and hence that bathers are expected for their health benefits.

INTRODUCCIÓN.

La contaminación de las fuentes termales es causada de manera directa o indirecta por el hombre, lo que puede acarrear efectos peligrosos para la salud humana, además de la reducción de usos recreacionales y turísticos en los balnearios.

Los problemas ambientales se han clasificado y plasmado en diversas escalas, en base a ellos muchos países han querido institucionalizar instrumentos que incorporen la variable ambiental; pero la UNESCO dijo que la gravedad y complejidad de esta problemática va cada vez en aumento, por lo que en 1992 se dio la Segunda Conferencia Mundial sobre Medio Ambiente y Desarrollo. (LIMON, A. 1997.)

A partir del siglo XVIII se inicia la Hidrología Médica con estudios analíticos de las aguas mineromedicinales. En España se realizó el Real Decreto el 29 de julio de 1816, el cual ayudo en el desarrollo científico al disponer que, “en cada uno de los balnearios acreditados debe existir un profesor empapado de las virtudes de las aguas y de la aplicación terapéutica para determinar su uso.”

En 1884 la disociación electrolítica explicó la composición química que presentan las Aguas Mineromedicinales y sus propiedades mineroterapéuticas dadas por los iones disueltos conocido como Crenoterapia. (BALL, P. 1999.)

Por otro lado, los estudios sobre la microbiota en las aguas termales comenzaron en el siglo XIX con el principal objetivo de identificar presencia de bacterias patógenas para poder controlar las enfermedades transmitidas por ellas. Dentro de los primeros análisis están los que se realizaron en el año 1838 en España por el Farmacéutico Pablo Prolongo, quien denominó a los copos que flotan en el agua termal como *Sulfuraria carratraquense*, posteriormente en el año de 1882 el Dr. Eduardo Moreno en sus análisis observó; bacterias “*sulfurarias*”, algas y hongos.

En 1897 el Dr. Santiago García Fernández incluyó en los análisis microbiológicos el conteo e identificación de microorganismos, algunos de los que encontró fueron; *Leptothrix*, *Beggiatoa*, *Micrococcus* y *Bacillus*. (WARD, D., et al. 1998.)

En los últimos años tras realizar estudios de varias termas ha ido variando la visión sobre la biodiversidad microbiana así como también sobre su composición, estructura y función. Las comunidades microbianas varían según el tipo de manantial caliente, lográndose aislar nuevas

bacterias termófilas con el fin de buscar una aplicación en la biotecnología. Por ejemplo la polimerasa usada en la técnica PCR se obtuvo de la bacteria termófila “*Thermus aquaticus*” (MILLER, S., & LASCANO A. 1995).

La presencia de microorganismos en el agua termal natural es inevitable, ya sea en las vertientes u ojos de agua debido a las muy cambiantes condiciones ambientales, meteorológicas o por acción directa o indirecta del hombre, así como también en piscinas de balnearios en donde es de esperarse una mayor concentración microbiana alóctona es decir de bacterias contaminantes que regularmente son patógenas como las bacterias coliformes. (OMS. 1995).

Dentro de la microbiota autóctona o alóctona de estas aguas se pueden encontrar microorganismos patógenos que pueden afectar la salud humana así como también reducir los usos recreacionales y turísticos de los balnearios. Según la UNESCO esto resulta en una problemática que cada vez va acrecentándose. (LIMON, A. 1997.)

El Balneario de las termas “La Virgen” por estar localizado en el centro de la ciudad turística de Baños de Agua Santa de la Provincia de Tungurahua, es muy visitado por bañistas nacionales e internacionales que necesitan aplicarse una crenoterapia, lo que conlleva a pensar que las piscinas tienen una microbiota alóctona elevada que no ha sido determinada, en la que pueden haber microorganismos potencialmente patógenos que pongan en peligro la salud de los bañistas. (WAGTER M. 1998.)

Con el objetivo de conocer la microbiota del agua usada para crenoterapia, en la presente trabajo de titulación se realizó la cuantificación de cuatro tipos de microorganismos indicadores; coliformes totales y fecales, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, Mohos y Levaduras, utilizando placas Petrifilm gracias a su fácil manejo y rápida determinación que disminuye tiempo y costos.

OBJETIVOS.

Objetivo General:

- Conocer la calidad microbiana de las aguas mineromedicinales de las Termas “La Virgen” ubicadas en la Parroquia Matriz del Cantón Baños de Agua Santa de la Provincia de Tungurahua.

Objetivos específicos:

- Recolectar muestras de agua de las termas de “La Virgen” de acuerdo a la Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1105:1983.
- Establecer In Situ las características fisicoquímicas; pH, temperatura, sólidos totales y conductividad que tiene el agua de las termas “La Virgen”.
- Determinar la concentración de bacterias heterótrofas aerobias mesófilas en las aguas mineromedicinales del balneario “La Virgen”.
- Cuantificar las bacterias del género coliformes totales y fecales, *Pseudomonas*, y *Staphylococcus aureus* presentes en las aguas termales “La Virgen”.
- Estipular el número de mohos y levaduras que se encuentran en los manantiales de las termas de “La Virgen”.
- Aislar e identificar taxonómicamente las bacterias encontradas mediante tinción Gram, pruebas bioquímicas y fisiológicas.
- Socializar los resultados obtenidos en este estudio con el GAD Municipal del Cantón Baños de Agua Santa, logrando de esta manera mejorar los servicios terapéuticos que brinda este Balneario a la comunidad.

CAPITULO I.

1. MARCO TEÓRICO.

1.1. El Agua.

1.1.1. *Agua Natural.*

El agua es un sistema complejo, no homogéneo, constituido por tres fases, una acuosa, una gaseosa y una sólida. La fase gaseosa corresponde a los vapores generados por la descomposición de materia orgánica en el suelo, los mismos que se adhieren a las aguas que proceden de las precipitaciones (lluvia).

Cierta cantidad de estas aguas circula por la red hidrográfica (Escorrentía), en este proceso van enriqueciéndose tanto de la circulación hipotérmica como de otros horizontes acuíferos, estas penetran en el suelo y subsuelo ya sea por percolación y/o filtración, durante este proceso las aguas cuantitativamente arrastran a su composición sales y/o minerales, por lo que podemos afirmar que las aguas minerales tienen origen endógeno o exógeno. (BRELS, D. 2008.)

1.1.2. *Aguas minero- termales.*

Por agua minero termal se conoce al agua natural que posee ciertas propiedades terapéuticas. El agua infiltrada es decir la subterránea, mientras va circulando va adicionando a su composición sales, gas y otros elementos imponderables que varían desde mínimas hasta grandes cantidades, de acuerdo con las características de las placas que atraviesan van adquiriendo propiedades terapéuticas propias de cada agua así como también su propia temperatura.

Las características fundamentales de este tipo de aguas radican en sus componentes químicos, su temperatura, la geoquímica, los gases y la radioactividad. Agua termal es considerada a aquella que tiene una temperatura mayor a 5°C de la del ambiente e donde se encuentra el manantial, generalmente se ubican a lo largo de las líneas de fallas ya que por estas puede introducirse y

calentarse en las profundidades, posteriormente suben a la superficie en forma de vapor y se condensan dando como resultado agua caliente. (**GASTANY G.** 1984.)

1.1.2.1. Sales presentes en aguas termales.

a) Origen endógeno.

En las zonas profundas de la corteza terrestre, los fenómenos magmáticos y volcánicos producen un sinnúmero de elementos químicos entre los que más se destacan están, los Halógenos (Flúor, Cloro, Bromo, Iodo), Sulfatos y Sulfuro de Hidrogeno los mismos que se adhieren al vapor de agua que se produce en ese sitio y son arrastrados hasta el sitio de almacenamiento.

Las aguas minero termales generalmente también presentan en su composición gases libres ya sea disueltos u ocluidos, los mismos que frente a un descenso de la presión se activan o desprenden surgiendo a la superficie mediante fenómenos como las mofetas de olor repugnante y a más de 50 °C. (**GASTANY G.** 1984.)

b) Origen exógeno.

Tanto en el suelo como en el subsuelo se encuentran localizadas rocas solubles y reservas de sales minerales, por esta razón es que las aguas que circulan por esta superficie van arrastrando y añadiendo a su composición dichas sales. Dentro de las rocas solubles podemos enumerar; calizas, dolomías/rocas sedimentarias y entre las sales minerales se encuentran; halita, sulfato de potasio, arseniato, carbonato, magnesio. (**GASTANY G.** 1984.)

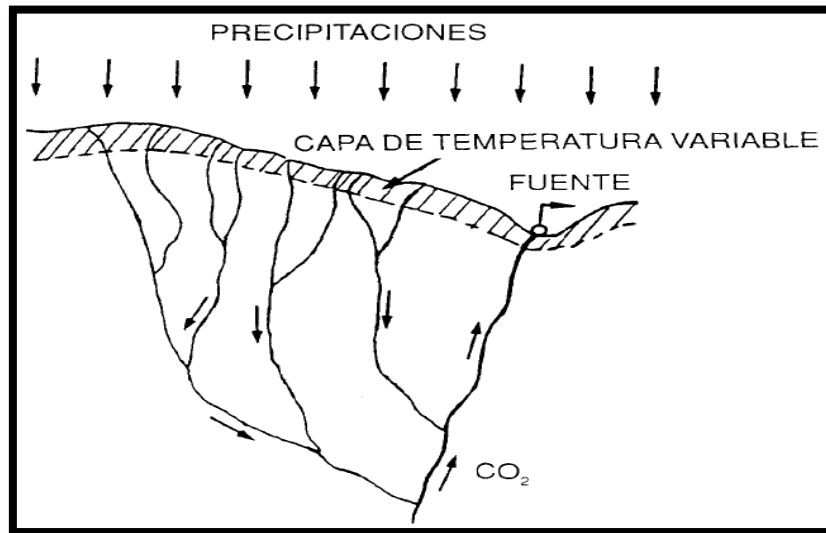
1.1.2.2. Origen de las aguas minero termales.

a) Origen meteórico.

Es el origen más común de las aguas termales; las aguas de las precipitaciones o meteóricas se infiltran en el subsuelo y por gravedad descienden hacia capas profundas, llevando consigo sales que disuelven durante su circulación subterránea, sus características fisicoquímicas son muy variables, su contenido mineral depende del terreno del que provienen y su temperatura de la profundidad de la que surgen que generalmente esta entre 35 – 40°C. (Ilustración 1-1).

Estas aguas salen a la superficie mediante las fisuras y fracturas abiertas en las rocas mediante mecanismos que trataremos más adelante. Por este motivo este origen tomo diferentes denominaciones; Vadoso, Geotérmico o Neptunismo. (GASTANY G. 1984.)

Ilustración 1-1. Bosquejo del origen geotérmico de las aguas termales.



Fuente: PINAGUA, J. 2010.

Realizado por: SORIA, Arturo. 2015

b) *Origen juvenil.*

La principal características de estas aguas es su alta temperatura y profundidad de la que surgen. Por este motivo encontramos tres tipos de orígenes; magmático, volcánico y por reacciones químicas. (GASTANY G. 1984.)

- *Origen magmático.*

El fenómeno de cristalización de los magmas libera sustancias volátiles en forma de fumarolas, constituidas por hidrógeno, vapor de agua, flúor, cloro, azufre, carbono, fosforo y boro principalmente. (PINAGUA, J. 2010.)

La composición química de este tipo de aguas es independiente de la roca de la que surgen, el contenido de minerales y sales son propias de cada una, mientras que la temperatura y las características hidrológicas son constantes para todas, ósea del tipo hipertermal. (GASTANY, G. 1984.)

- *Origen volcánico.*

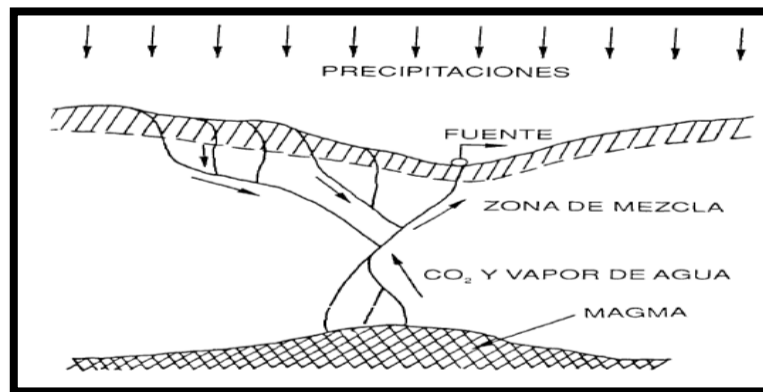
Estas aguas juveniles son el resultado de la consolidación de lavas y de vapor de agua de origen volcánico, destilación de aguas profundas, surgimiento del vapor de agua de las capas internas, en su mayoría van adjuntas con gases como; el nitrógeno, anhídrido carbónico, sulfhídrico y fluorhídrico. (GASTANY, G. 1984.)

- *Origen por reacciones químicas.*

En el seno de la litosfera se presentan continuamente un sinnúmero de reacciones químicas las cuales producen agua. (GASTANY, G. 1984.)

Hay que tener muy en cuenta que las aguas de arrastre pueden producir sedimentos que se almacenan en los fondos marinos, estas son capaces por oclusión de producir las denominadas aguas fósiles, generalmente ricas en cloruro de sodio, bromo y yodo. Otro punto importante es que también se puede encontrar aguas termales de origen mixto, es decir por mezclas de aguas geotérmicas con aguas endógenas o fósiles. (Ilustración 2-1). (PINAGUA, J. 2010.)

Ilustración 2 – 1. Bosquejo del origen mixto de las aguas termales.



Fuente: PINAGUA, J. 2010.

Realizado por: SORIA, Arturo. 2015

1.1.2.3. Fuentes termales.

Para que se dé la ascensión de las aguas profundas es necesaria la existencia de una fisuración activa, es decir de fisuras o fracturas abiertas, las mismas que condicionan los tipos de surgencias. Los accidentes geológicos que comúnmente favorecen la surgencia del agua son: diaclasas,

regiones milotinizadas, contactos geológicos, fisuras, fallas, filones, filones metalíferos y diques eruptivos.

La velocidad y capacidad de surgencia de las aguas termales están definidas por dos tipos de condiciones;

- Fracturación intensa con presencia de fase(s) tectónica(s), la misma que a veces puede estar acentuada por actividad volcánica.
- Presencia de depresiones o valles.

En muchas ocasiones las zonas por donde emergen las aguas termales pueden estar cubiertas por capas protectoras de sedimentos o precipitados, en estos casos es necesario perforarlas para acceder a las captaciones. (PINAGUA, J. 2010.)

1.1.2.4. *Mecanismos de surgencia de aguas termales.*

La circulación subterránea está determinada por los siguientes fenómenos; gradiente hidráulica, expansión del vapor de agua, acción de los gases ocluidos y disueltos, y la temperatura

Gradiente Hidráulico; afecta la circulación de las aguas subterráneas, sean estas o no termales. Presenta zonas de recarga a una altura más alta que las zonas de acumulación.

Expansión del vapor de agua; regula la circulación de las aguas hipertermales, tiene vital importancia en el funcionamiento de los géiseres, fumarolas y la intensidad de surgencia ya que al entrar en contacto, el agua con las rocas a altas temperaturas, por una parte se da la vaporización del agua y por otra la disociación con adhesión de oxígeno.

Acción de los gases ocluidos y disueltos; presentan en primer lugar una acción física; reducen el peso específico de las aguas, y luego una acción dinámica para emulsionar el agua por acción de la presión y provocar su elevación. Por otro lado actúan sobre la densidad, la misma que influye en la rapidez de surgencia y los caudales del gas y del líquido es decir sobre la carga hidráulica. Los gases más influyentes son; el anhídrido carbónico y el vapor de agua.

Acción de la temperatura; los efectos de esta son variar la masa específica del agua y su viscosidad; de tal manera que si se supera el gradiente adiabático se vuelve inestable el caudal y por convección térmica fluye a la superficie.

Por otro lado tenemos que la diferencia de densidad entre el agua fría y la caliente provoca el fenómeno de termosifón que es directamente proporcional con el caudal. Al aumentar la temperatura, la viscosidad disminuye, es decir retarda la velocidad de circulación. (PINAGUA, J. 2010.)

1.1.2.5. Origen del flujo calórico.

El grado calórico es la característica más relevante dentro de las aguas termales, la misma está en dependencia de efectos fisiológicos e hidrodinámicos es decir de la gradiente geotérmica en donde están vinculadas, la conductividad térmica de las rocas y el flujo de calor transmitido desde el núcleo de la tierra que está a 4000°C. Según esta determinación podemos afirmar que la temperatura es directamente proporcional a profundidad de la Litosfera. (JAUPART, C., & MARESCHAL, J.C. 2003.)

Un factor importante que determina la temperatura del agua es el caudal, el cual es directamente proporcional a ésta (más volumen mayor temperatura), mientras que el contenido mineral es indistinto de la temperatura y del caudal. Un agua natural para ser considerada termal debe presentar una temperatura superior en 5 °C o más con respecto a la temperatura promedio del ambiente del lugar de brote de la fuente. (GASTANY, G. 1984.)

En flujo calórico está dividido en dos zonas; las normales que constituyen alrededor de 90 % de la litosfera, esta zona corresponde a las cuencas sedimentarias, las plataformas de las cordilleras alpinas periféricas y las llanuras abisales, que se encuentran a 4000 metros bajo el nivel del mar, y las zonas anormalmente calientes que se presentan en regiones con actividad sísmica y/o de actividad volcánica presente o reciente, dichas regiones son las localizadas en el cinturón de fuego del pacífico así como también las dorsales medio oceánicas y arcos insulares. (PINAGUA, J. 2010.)

La temperatura en zonas normales aumenta en promedio 3°C cada 100 metros de profundidad, mientras que en zonas anormalmente calientes puede variar de 15 a 50°C el aumento por cada 100 metros. (JAUPART, C., & MARESCHAL, J.C. 2003.)

En cada una de las rocas existentes en la corteza terrestre podemos encontrar cantidades apreciables de elementos radioactivos como son; los isótopos; U^{238} , U^{235} , el Th^{232} , y el K^{40} , los mismos que sufren reacciones nucleares para convertirse en Pb los isótopos del uranio y torio, mientras que los

isótopos del potasio se convierten en Calcio 40, este sinnúmero de reacciones dan lugar a liberación de energía capaz de producir el flujo de calor en la corteza terrestre. (PINAGUA, J. 2010.)

El valor normal del flujo de calor del continente es 60 mW/m^2 , mientras que en regiones anormales de la litosfera varia notablemente; en zonas antiguas que son gruesas se reduce a 30 mW/m^2 y en zonas más jóvenes que tienen menor grosor pueden superarse los 120 mW/m^2 . (INSTITUTO CARTOGRAFICO Y GEOLOGICO DE CATALUÑA. 2014).

1.1.2.6. Clasificación de las aguas termales.

La clasificación de las aguas termales y minerales esta dado de diferentes puntos de vista; por su uso, origen, temperatura, tonacidad, mineralización global, composición fisicoquímica, acciones terapéuticas, etc. (ARMIJO, M., & SAN MARTIN, J. 2010a.)

a) Según su uso.

Tenemos aguas; mineral natural, mineral medicinal, mineral termal y mineral industrial. (ARMIJO, M., & SAN MARTIN, J. 2010a.)

b) Según su origen.

Según Gautier existen aguas superficiales y profundas. Según Davis las aguas subterráneas pueden ser; (ARMIJO, M., & SAN MARTIN, J. 2010a.)

- *Marinas*; agua del océano que recientemente han inundado rocas y sedimentos no consolidados.
- *Meteóricas*; agua subterránea que en tiempo reciente entro en el ciclo hidrológico.
- *Congénitas*; agua que no está en contacto con la atmosfera desde hace mucho tiempo.
- *Metamórficas*; agua que durante su metamorfismo está en contacto con rocas.
- *Magmáticas*; agua producida en los magmas no muy profundos.
- *Plutónicas*; agua producida en los magmas profundos.
- *Juveniles*; agua que está en contacto con la atmósfera.

White clasifica a las aguas por su origen así; (FAGUNDO, J. 1996)

A. Aguas juveniles; aguas que están en contacto con la atmósfera.

- Magnéticas.
- Otras.

B. Aguas surgentes o reciclables; aguas que están en circulación de la litosfera.

- Meteóricas.
 - Aguas de las precipitaciones.
 - Aguas del suelo.
 - Aguas subsuperficiales.
- Oceánicas que penetran los acuíferos.
 - Fósiles o Connatas.
 - De origen marino
 - De origen no marino
- Metamórficas
 - Aguas con concentración elevada en CO₂ y Boro.
 - Otras

C. Aguas magmáticas.

c) Según su temperatura.

En relación con la Temperatura Indiferente del Organismo y desde el punto de vista hidroterapéutica tenemos; (ARMILJO, M., & SAN MARTIN, J. 2010a.)

- Hipotermales: hasta 35°C.
- Mesotermales: dentro del rango 35-37 °C.
- Hipertermales: mayor a 37°C.

Según Gramova las aguas se clasifican en; (GRAMOVA, V., et al. 1994.)

- Extremadamente frías: hasta 0°C.
- Muy frías: dentro de 0 a 4°C.
- Frías: entre 4 a 20°C
- Termales débiles: dentro de 20 a 35 °C.

- Termales calientes: entre 35 a 42°C.
- Termales altas: entre 42 a 100°C.
- Extremadamente calientes: aguas de regiones de vulcanismo, temperatura mayor a 100°C.

La clasificación más común a nivel universal es que encontramos en la literatura, la misma que la clasifica así; (**ARMIJO, M., & SAN MARTIN, J.** 2010a.)

- Frías: hasta 20°C
- Hipotermales: varían de 20 a 35°C.
- Mesotermales: varían de 35 a 50 °C.
- Hipertermales: varían de 50 a 100°C.

d) Según la tonacidad.

En esta clasificación se toman en cuenta la presión osmótica, la misma que se define como la cantidad de iones disueltos expresado en milimoles por litro y el descenso crioscópico. Según la literatura española en relación al estado isotónico se las clasifica en; (**LOPEZ GETA, J., & BAEZA, C.** 1986.)

- Hipotónicas: concentraciones menor a 325 mmol/L.
- Isotónicas: concentraciones iguales a 325 mmol/L.
- Hipertónicas: concentraciones mayor a 325 mmol/L.

En cuanto al descenso crioscópico se las clasifica en; (**ARMIJO, M., & SAN MARTIN, J.** 2010a.)

- Hipotónicas: valores inferiores a -0.55°C.
- Isotónicas: valores entre -0.55 a -0.58
- Hipertónicas: valores superiores a -0.58

e) Según el pH.

Según la Norma Cubana de Agua Mineral a las aguas se las clasifica en; (**NC 93-01-218.** 1995.)

- Ácidas: pH inferior a 6.8
- Neutras: pH entre 6.8 a 7.2
- Alcalinas: pH mayor a 7.2

f) *Según su composición químico-física.*

Según el método de Kurlov, en el que se consideran los aniones y cationes con concentración mayor a 20 % de meq/L, tenemos: (FAGUNDO, J. 1996.)

- En relación a los aniones:
 - Sulfatadas.
 - Cloruradas.
 - Bicarbonatadas sulfatadas.
 - Bicarbonatadas cloruradas.
 - Sulfatocloruradas.
 - Sulfatocloruradas bicarbonatadas.

- En relación a los cationes:
 - Cálcidas
 - Magnésicas
 - Sódicas
 - Calcicomagnesianas
 - Calcicosódicas
 - Mnesicosódicas
 - Cálculo_Magnésico_ Sódicas.

g) *Según las acciones terapéuticas.*

Esta clasificación es poco precisa debido a que su acción varía en un organismo sano y un organismo enfermo, la mejor agrupación para esta clasificación es en base a la composición química emparentada con su actividad terapéutica, así tenemos: (ARMIJO, M., & SAN MARTIN, J. 2010b.)

- *Sulfuradas*: sus acciones son; antialérgicas, desintoxicante, antirreumáticas, antiflogísticas.
- *Cloruradas*: sus acciones terapéuticas son; anticatarrales, antiinflamatorias.
- *Sulfatadas*: presentan acciones; colagogas y purgantes.
- *Cálcidas*: sus principales acciones son; antialérgicas, sedantes, antiinflamatorias,
- *Ferruginosas*: con actividad anti anémicas y reconstituyentes.
- *Radiactivas*: presentan actividad Equilibradoras y Sedantes.
- *Oligometálicas*: su acción es ser Diuréticas.

En un Informe del Instituto de Geología y Minas de España, agrupan a las agua minero medicinales así; (**LÓPEZ GETA, J., & BAEZA, C.** 1989.)

- Según los efectos que producen en el organismo.
- Según las enfermedades que presenta beneficios.
- Según el órgano que actúan:
 - Aparato digestivo, nutrición y piel.
 - Aparato circulatorio y respiratorio.
 - Reumatismo.
 - Sistema nervioso.

1.1.2.7. Ambientes Geotermales.

1.1.2.7.1. Géiseres.

Son expulsiones de agua termal, se produce por el aumento de presión debido a la producción violenta de vapor en una cavidad subterránea, la cual está llena de agua fría y por su base circula agua caliente. Esta se vacía y llena periódicamente. (**ALFARO, C.** 2002.)

1.1.2.7.2. Fumarolas.

Son descargas sonoras de mezclas de vapor, agua caliente y de gases (CO₂ y H₂S). Existen dos tipos de fumarolas; las hidrotermales, caracterizadas por tener temperaturas cercanas al punto de ebullición del agua, se originan por ebullición y separación rápida del vapor geotérmico, contienen altas cantidades de CO₂ y H₂S y un pH ácido (2-5).

Por otro lado las fumarolas volcánico- magmáticas se caracterizan por tener temperaturas superiores a las de ebullición del agua, inclusive puede alcanzar 700°C, contienen alta concentración de cloruro y fluoruro de hidrogeno, moderada cantidad de CO₂, su especie azufrada es SO₂ y su pH es muy ácido (0-2). (**ALFARO, C.** 2002.)

1.1.2.7.3. Solfataras.

Son fumarolas que emiten fluidos de vapor de agua con ácido sulfhídrico pero no superan los 100°C. (**ALFARO, C.** 2002.)

1.1.2.7.4. Mofetas.

Son fumarolas frías que surgen por grietas en regiones volcánicas y cráteres luego de erupciones, generalmente desprende CO₂. (ALFARO, C. 2002.)

1.1.2.7.5. Soffioni.

Son fumarolas que emiten vapor de agua, con una temperatura superior a 100°C, normalmente surgen por grietas de regiones volcánicas y al enfriarse depositan ácido bórico y boratos. (ALFARO, C. 2002.)

1.1.2.7.6. Fuentes Termales.

Son fluidos con gran estabilidad en su temperatura y flujo. Contienen gases como CO₂ y H₂S y su temperatura depende de la región por donde surgen. (ALFARO, C. 2002.) En cuanto al valor de pH, tenemos dos parámetros; el uno de 1.8 a 2.2 y el otro de 7.5 a 9.0, esto se debe a la presencia de sustancias tampón como el H₂SO₄ que tiene un pH de 1.8 y el carbonato o bicarbonato que tiene un pH entre 6.5 y 10.2. (DIAZ, P., et al. 1998.)

- *Propiedades fisicoquímicas de las aguas minerales.*

La composición química de las aguas naturales está determinada por factores como el climatológico, antrópico, pedológico, geomorfológico, hidrogeológico, geológico y químico físico. Así tenemos que la percolación de las precipitaciones en; (FAGUNDO, J. 1990.)

- Rocas salinas origina aguas acuíferas de tipo cloruradas alcalinas.
- Depósitos de yeso a anhidrita se origina aguas de tipo sulfatadas cálcicas.
- Calizas y dolomías se origina del tipo bicarbonatadas cálcicas o cálcico magnésicas.
- Secuencias ricas en piritita se produce aguas sulfatadas.
- Granitos y otras rocas insolubles acidas se produce, según el tipo de catión, aguas del tipo alcalinas o alcalino-terreas.
- Rocas ultra básicas originan aguas bicarbonatadas magnésicas.

La composición de las aguas minerales solo reflejan las propiedades propiamente del acuífero, y del flujos hidrotermales y mas no de los fluidos que lo alimentan. Las leyes termodinámicas son

las que determinan la composición química, entre ellas tenemos; solubilidad de minerales, concentración de gases en disolución, pH, potencial Redox, fuerza iónica, y efecto del ion común.

La litología es la encargada de fijar las facies hidroquímicas dominantes y por tanto el tipo del agua, es decir si los terrenos por donde drenan las aguas son cársicos carbonatados, estas serán del tipo bicarbonatadas cálcicas. La hidrogeología determina la concentración de CO₂, la dureza, así como también la permeabilidad del acuífero, la región por donde circula, el tipo de flujo y la velocidad de circulación. (ALVAREZ, E., et al. 1990.)

La descomposición bacteriana de la materia orgánica dentro del acuífero origina CO₂, el mismo que es abundante en zonas de alimentación y aireación, mientras que en zonas de emisión y alimentación este va decreciendo y el pH del agua se incrementa. Por otro lado las aguas se mineralizan en la región saturada, aunque también pueden darse mezclas y volverse agresivas, es decir seguir disolviendo más minerales.

Las aguas que circulan por regiones profundas son ricas en CaCO₃, CaSO₄ y NaCl disueltos y presentan temperaturas elevadas y estables. La geomorfología también fija la composición química de las aguas, entre estos factores tenemos; el escarpe de los macizos, el tipo de vegetación, el grado de erosión del terreno y el tipo de relieve.

Los factores pedológicos por su parte rigen la composición química y microbiológica de las aguas, tanto del tipo de suelo como de las condiciones climáticas al que está sometido depende la producción de gases, la actividad microbiana y la disponibilidad de ácidos, ya que estos son arrastrados por las aguas meteóricas hacia el interior de los acuíferos.

Los factores climáticos más influyentes son; la temperatura, la humedad relativa, intensidad y tiempo de precipitaciones y/o radiaciones y velocidad del aire. (FAGUNDO, J. 1990.)

- *El pH del agua.*

Generalmente el agua pura debería tener un valor de pH 7, pero esto no sucede ya que al estar en contacto con la atmosfera esta es capaz de disolver CO₂ y por tanto varía en un rango de 6 a 9. En manantiales volcánicos donde existe la presencia de HCl y SO₂ las aguas son acidas.

Las precipitaciones filtradas por el suelo, donde existe gran cantidad de CO₂, tienen un pH promedio de 4.5, al interaccionar con las rocas carbonatadas, el valor sube hasta alrededor de 7, si

la interacción es prolongada, el agua se carga con altas concentraciones de HCO_3 y iones CO_3 , lo que lo alcaliniza a un pH cercano a 8.4. En manantiales de regiones no cársicas el rango de pH va desde 5 hasta 6,5; mientras que en zonas cársicas en pH esta entre 7 a 8.

Las aguas de origen marino poseen un valor de pH alrededor de 8, mientras que las aguas minerales poseen pH en base a la hidrogeología por donde circulan, pueden ser acidas, neutras o básicas. (FAGUNDO, J. 1990.)

- *Sistema abierto y cerrado respecto al CO_2 .*

Cuando la concentración de CO_2 es constante durante todo el proceso de disolución de minerales carbonatados por parte de las aguas minerales, consideramos un sistema abierto. Mientras que cuando la disolución se da en base solo al suministro inicial de CO_2 , y éste jamás se repone, tenemos un sistema cerrado con respecto al CO_2 . En la naturaleza generalmente la disolución de los carbonatos se da mediante los dos sistemas. (FAGUNDO, J. 1990.)

- *Efecto del ion común y efecto salino.*

La capacidad de disolución de minerales de un agua, se ve disminuida cuando en su seno lleva minerales comunes, mientras que cuando existe alta concentración de minerales en su seno, la solubilidad se ve incrementada para minerales no comunes, este fenómeno se conoce como “Efecto Salino o de Fuerza Iónica”. Este efecto se da gracias a que se incrementa la fuerza iónica y se disminuye el coeficiente de actividad. (FAGUNDO, J. 1990.)

- *Potencial de Oxido Reducción.*

En el sistema de aguas subterráneas, se da la transferencia entre constituyentes disueltos, gases o sólidos mediante un sinnúmero de reacciones químicas, este proceso cambia los estados de oxidación o reducción tanto de los reaccionante como de los productos. Los elementos de valencia variable, son los que en un momento dado pueden ceder o ganar electrones.

La fuerza de una reacción de óxido reducción se puede medir mediante el potencial redox (pE), el mismo que es análogo al pH y mide la tendencia oxidante o reductora de una solución. (FAGUNDO, J. 1990.)

1.2. Microbiología.

1.2.1. *Microorganismos de ambientes extremos.*

Ciertos microorganismos son capaces de sobrevivir y proliferar en temperaturas menores de 10°C, por encima de 50°C, en valores de pH menores a 5.0 y mayores a 8.0, en valores de presión mayor a 1 atm y en concentraciones de sal por encima de 30g/L, todos estos son considerados como Extremófilos.

Generalmente a los microorganismos extremófilos encontramos en regiones geotermales con temperaturas elevadas, regiones polares donde la temperatura se encuentra a niveles de congelación del agua, en las profundidades de los océanos donde existe muy alta presión y en manantiales ácidos a alcalinos. (COSTANTINOS, E., & ANTRANIKIAN G. 2004.)

1.2.2. *Clasificación de microorganismos extremófilos.*

Cuadro 1- 1. Clasificación de microorganismos extremófilos.

EXTREMOFILOS	MINIMO	OPTIMO	MAXIMO
Termófilos		> 50°C	> 60°C
Termófilos extremos	> 35°C	≥ 65°C	> 70°C
Hipertermófilos	> 60°C	≥ 80°C	> 85°C
Acidófilos	pH > 0	2.5 ≤ pH ≤ 3.0	
Alcalinotolerantes		pH < 8.5	pH ≥ 9.0
Alcalófilos		pH ≥ 8.5	pH ≥ 10
Halófilos tolerantes		2% ≤ NaCl ≤ 5%	
Halófilos moderados		5% ≤ NaCl ≤ 20%	
Halófilos extremos		20% ≤ NaCl ≤ 30%	
Psicrófilos	= 0°C	< 25-30°C	
Barófilos	> 0.1 MPa	= 10-50 MPa	ø 100 MPa

Fuente: MOSÉ R., et al. 2002.

Realizado por: Soria Arturo. 2015.

Estos microorganismos se los agrupa de acuerdo a las circunstancias del medio en el que habitan, entre ellos tenemos; termófilos, hipertermófilos, halófilos, psicrófilos, alcalófilos, acidófilos y barófilos. (MOSÉ R., et al. 2002.)

1.2.3. *Microorganismos termófilos.*

1.2.3.1. *Generalidades.*

Estos microorganismos son capaces de sobrevivir a temperaturas mayores de 45°C. Dentro de este grupo tenemos varios subgrupos; (PEDROZA, A. 2001.)

- *Termófilos*; crecen óptimamente en un rango de temperatura de 45 – 70°C; entre ellos tenemos, *Bacillus acidocaldarius* y *Bacillus Stearothermophilus*.
- *Termófilos extremos*; crecen en un rango de temperatura de 70-80°C; dentro de este grupo tenemos, *Thermus aquaticus* y *thermoanaerobacter ethanolicus*.
- *Hipertermófilos*; crecen óptimamente por encima de los 80°C; en este grupo encontramos, *Thermotoga marítima* y *Pyrococcus furiosus*.

Cuadro 2-1. Características generales de los microorganismos termófilos.

ESPECIES	CONDICIONES DE CRECIMIENTO			pH	Aeróbico (ae) o anaeróbico (an)	Biotipo (marino (m) o terrestre (t))	DNA G+C (MOL %)
	Temperatura (°C)						
	Mínimo	Óptimo	Máximo				
<i>Thermotoga maritima</i>	55	80	90	5.5 - 9	an	m	46
<i>Aquifex pyrophilus</i>	67	85	95	5.4 - 7.5	ae	m	40
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	60	75	85	1 - 5	ae	t	37
<i>Metallosphaera sedula</i>	50	75	80	1 - 4.5	ae	t	45
<i>Acidianus infernus</i>	60	88	95	1.5 - 5	ae/an	t	31
<i>Stygiolobus azoricus</i>	57	80	89	1 - 5.5	an	t	38
<i>Thermoproteus tenax</i>	70	88	97	2.5 - 6	an	t	56
<i>Pyrobaculum islandicum</i>	74	100	103	5 - 7	an	t	46
<i>Pyrobaculum aerophilum</i>	75	100	104	5.8 - 9	ae/an	m	52
<i>Thermofilum pendens</i>	70	88	95	4- - 6.5	an	t	57
<i>Desulfurococcus mobilis</i>	70	85	95	4.5 - 7	an	m	51
<i>Thermosphaera aggregans</i>	67	85	90	5 - 7	an	t	46
<i>Sulfophobococcus zilligii</i>	70	85	95	6.5 - 8.5	an	t	54
<i>Staphylothermus marinus</i>	65	92	98	4.5 - 8.5	an	m	35
<i>Thermodiscus maritimus</i>	75	88	98	5 - 7	an	m	49
<i>Aeropyrum pernix</i>	70	90	100	5 - 9	ae	m	67
<i>Stetteria hydrogenophila</i>	70	95	102	4.5 - 7	an	m	65
<i>Igneococcus islandicus</i>	65	90	100	3.9 - 6.3	an	m	41
<i>Pyrodictium occultum</i>	82	105	110	5 - 7	an	m	62
<i>Hyperthermus butylicus</i>	80	101	108	7	an	m	56
<i>Pyrolobus fumarii</i>	90	106	113	4.0 - 6.5	ae/an	m	53
<i>Thermococcus celer</i>	75	87	93	4 - 7	an	m	57
<i>Thermococcus alcaliphilus</i>	56	85	90	6.5 - 10.5	An	M	43
<i>Pyrococcus furiosus</i>	70	100	105	5 - 9	an	m	38
<i>Archaeoglobus. fulgidus</i>	60	83	95	5.5 - 7.5	an	m	46
<i>Ferroglobus placidus</i>	65	85	95	6 - 8.5	an	m	43
<i>Methanothermus sociabilis</i>	65	88	97	5.5 - 7.5	an	t	33
<i>Methanopyrus kandleri</i>	84	98	110	5.5 - 7	an	m	60
<i>Methanococcus jannashii</i>	50	85	86	5.5 - 6.5	an	m	31
<i>Methanococcus igneus</i>	45	88	91	5 - 7.5	an	m	31

Fuente: STETTER, K. 1999.

Realizado por: SORIA, Arturo. 2015.

1.2.3.2. Hábitat.

Este tipo de microorganismos se los puede encontrar en diversos ambientes como manantiales termales, desiertos, géiseres, sistemas hidrotermales marinos, solfataras y suelos geotérmicamente calientes. (MARTEINSSON, V., et al. 2001.)

Estos hábitats geotérmicos son ricos en sulfuro y azufre elemental. Este último se forma a partir del H₂S de origen geotérmico mediante una reacción de oxidación espontánea de H₂S con O₂ o por reacción del H₂S con SO₂ presente en los gases volcánicos. En hábitats terrestres, los manantiales con abundante azufre, los depósitos de lodo y los suelos pueden tener temperaturas de 100°C. (MADIGAN, M., et al. 2000.)

Dentro de los biotipos marinos podemos encontrar superficiales, sedimentos calientes profundos y sistemas hidrotermales. Este último es rico en sal (3%) y presenta un rango de pH que va desde 5-8.5. Generalmente los microorganismos que encontramos en estos hábitats son anaerobios debido a que la solubilidad del oxígeno disminuye al aumentar la temperatura y en ellos pueden habitar organismos que necesiten nula o bajas cantidades de oxígeno. (EDWARDS, C., et al. 1990.)

Los microorganismos termófilos e hipertermófilos anaerobios han sido aislados de sistemas marinos geotérmicamente calientes, sistemas hidrotermales marinos, manantiales termales y fumarolas. (ANDRADE, C., et al. 1999.)

Cuadro 3-1. Fuente de microorganismos que dan enzimas termolábiles.

FUENTE	MICROORGANISMO	ENZIMA
Fuente termal	<i>Thermus</i> sp.	α -Amilasa
Fuente termal	<i>Bacillus</i> sp. WN.11	α -Amilasa
Sistemas hidrotermales marinos	<i>Staphylothermus marinus</i>	α -Amilasa
Solfatara marina	<i>Thermococcus litoralis</i>	Pululanasa
Fuente termal	<i>Bacillus thermoleovocans</i> ID-1	Lipasa
Compost de cáscara de cítricos fermentada, residuos de extractos de café y té	<i>Bacillus strain</i> MH-1	Endoquitinasa
Compost	<i>Bacillus stearrowthermophilus</i> CH-4	β -N-acetilhexosaminidasa
Sistemas hidrotermales marinos	<i>Pyrococcus abyssi</i>	Fosfatasa alcalina
Sedimentos de fuentes termales	<i>Bacillus</i> sp. 3183	α -Amilasa

Fuente: HAKI, G. & RAKSHIT S. 2003.

Realizado por: SORIA, Arturo. 2015.

1.2.3.3. Taxonomía.

Dentro del grupo de microorganismos tenemos dos dominios; Archaea y Bacteria. Los reinos pertenecientes al dominio Archaea son; *Euryarchaeota* y *Crenarchaeota*, estos presentan límites extremos de tolerancia fisiológica frente a factores fisicoquímicos. Los organismos del reino *Crenarchaeota* son termófilos o hipertermófilos, generalmente sus hábitats son sistemas hidrotermales submarinos o continentales. (BURGGRAF, S., et al. 1997.)

“Dentro de este reino *Crenarchaeota* están los géneros; *Thermoproteus*, *Caldisphaera*, *Caldivirga*, *Desulfurococcus*, *Thermocladium*, *Acidilobus*, *Vulcanisaeta*, *Aeropyrum*, *Thermofilum*, *Ignicoccus*, *Sulfurococcus*, *Staphylothermus*, *Sulfurisphaera*, *Stetteria*, *Stygiolobus*, *Sulfophobococcus*, *Metallosphaera*, *Thermodiscus*, *Acidianus*, *Thermosphaera*, *Sulfolobus*, *Pyrodictium*, *Pyrolobus* e *Hyperthermus*.”

“En el reino *Euryarchaeota* se encuentran los metanógenos de los géneros; *Methanopyrus*, *Methanobacterium*, *Methanosarcina*, *Methanothermobacter*, *Methanoculleus*, *Methanothermobacter*, *Methanocaldococcus*, *Methanococcus*, *Methanothermobacter*”. (GARRITY, G., et al. 2004.) A este reino también pertenecen los géneros *Thermococcus* y *Pyrococcus* que son organótrofos anaerobios”, (SOKOLOVA, T., et al. 2001.) y “*Archaeoglobus* que es sulfato reductora”. (HUBER, R., et al. 1997.)

Dentro del dominio Bacteria tenemos los géneros termófilos heterotróficos;

- “*Thermotogales*; que incluyen los géneros; *Thermotoga*, *Thermosiphon*, *Fervidobacterium*, *Geotoga*, *Petrotoga* y *Marinitoga*”.
- “*Clostridiales*; incluyen los géneros, *Clostridium*, *Caloramator*, *Caloranaerobacter*, *Thermobrachium*, *Anaerobaculum*, *Anaerobranca*, *Thermosyntrophus*, *Thermohydrogenium*, *Thermanaerovibrio*, *Thermaerobacter*, *Syntrophothermus*, *Carboydocella*, *Caldicellulosiruptor*.” (ALAIN, K., et al. 2002.)
- “*Deferribacterales*; que contiene los géneros *Deferribacter* y *Thermothrix*.” (GRENNE, A., et al. 1997.)
- “*Thermoanaerobacterales*; que almacena los géneros, *Thermoanaerobacter*, *Thermoanaerobacterium*, *Ammonifex*, *Caldanaerobacter*, *Coprothermobacter*,

Carboxydibrachium, Gelria, Moorella, Sporotomaculum, Thermacetogenium, Thermoanaerobium y Thermavenabulum.”

- “*Bacteroidales*; que incluyen los géneros *Thermodesulfobium, Acetothermus* y *Anaerophaga*”. (GARRITY, G., et al. 2004.)

“Dentro del grupo de bacterias sulfato reductoras tenemos los géneros *Desulfotomaculum, Desulfacinum, Thermodesulforhabdus, Thermodesulfovibrio* y *Thermodesulfobacterium.*” (SIEVERT, S., & KUEVER. J. 2000.)

Dentro del dominio Bacteria también se incluyen microorganismos termófilos e hipertermófilos aerobios heterótrofos y autótrofos. Dentro del grupo de heterótrofos tenemos los géneros;

- “*Thermus*; que incluye las especies, *Thermus thermophilus, T. aquaticus, T. filiformis, T. brockianus, T. antranikianii, T. igniterrae* y *T. oshimai.*” (CHUNG, A., et al. 2000.)
- “*Rhoadothermus*; en el que encontramos la especie *R. marinus.*” (SAKO, T. 1996.)
- “*Thermoaerobacter*; en el que tenemos la especie *T. mariensis.*”

“Dentro del grupo de microorganismos aerobios autótrofos termofílicos se presenta el género microaerofílico *Aquifex*, el cual está representado por la especie *A. pyrophilus.*” (STHOR, R. 2001.)

1.2.3.4. *Metabolismo de microorganismos termófilos anaerobios.*

Los organismos anaerobios termófilos e hipertermófilos presentan dos tipos de metabolismo; aquellos que obtienen energía de la oxidación de material inorgánico, conocido como Quimiolitotróficos y aquellos que obtienen energía de la oxidación de materia orgánica, llamados Quimiorganótrofo.

En ambos tipos de metabolismo la oxidación se puede incrementar en rendimiento al usar aceptores externos de electrones, esto para compuestos orgánicos e inorgánicos que usen como fuente de carbono. (PANCHÓN, L., & POSADA Y. 2003.)

La fuente de carbono más común, en los microorganismos termófilos son los carbohidratos poliméricos como; xilano, celulosa, ácido poligalacturónico, almidón, y lignina. Los organismos

termófilos del dominio Archaea usan componentes proteicos, mientras que los organismos termofílicos e hipertermofílicos heterótrofos usan mezclas de péptidos como; peptona, triptona o extracto de levadura. (ANDRADE, C., et al. 1999, CANN I. et al. 2001.)

Casi la totalidad de los microorganismos termófilos anaerobios necesitan de azufre, ya que para la respiración anaeróbica se necesita de un aceptor de electrones y para el metabolismo quimiolitotrófico de un donador de electrones. El azufre elemental usando electrones productos de la oxidación de compuestos orgánicos o de Hidrogeno molecular, se reduce a H₂S. Cada género de microorganismo termófilo obtiene energía a partir de una reacción característica. (Cuadro 4-1). (MADIGAN M. et al. 2000.)

Cuadro 4-1. Reacciones productoras de energía en Microorganismos Termofílicos.

REACCIÓN PRODUCTORA DE ENERGÍA	GÉNERO
$4\text{H}_2 + \text{CO}_2 \longrightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$	<i>Methanopyrus</i> <i>Methanothermus</i> <i>Methanococcus</i>
$\text{H}_2 + \text{S}^0 \longrightarrow \text{H}_2\text{S}$	<i>Pyrodictium</i> <i>Thermoproteus</i> <i>Pyrobaculum</i> <i>Acidianus</i> <i>Stygioglobus</i>
$4\text{H}_2 + \text{H}_2\text{SO}_4 \longrightarrow \text{H}_2\text{S} + 4\text{H}_2\text{O}$	<i>Archaeoglobus</i>
$3\text{H}_2 + \text{H}_2\text{SO}_3 \longrightarrow \text{H}_2\text{S} + 3\text{H}_2\text{O}$	<i>Archaeoglobus</i>
$5\text{H}_2 + \text{S}_2\text{O}_3^{2-} \longrightarrow 2\text{H}_2\text{S} + 3\text{H}_2\text{O}$	<i>Pyrolobus</i> <i>Archaeoglobus</i> <i>Ferroglobus</i>
$\text{H}_2 + \text{HNO}_3 \longrightarrow \text{HNO}_2 + 4\text{H}_2\text{O}$	<i>Pyrobaculum</i> <i>Aquifex</i> <i>Pyrolobus</i>
$4\text{H}_2 + \text{H}^+ + \text{NO}_3^- \longrightarrow \text{NH}_4^+ + \text{OH}^- + 2\text{H}_2\text{O}$	<i>Pyrolobus</i>
$\text{H}_2 + 1/2\text{O}_2 \longrightarrow \text{H}_2\text{O}$	<i>Pyrolobus</i> <i>Pyrobaculum</i> <i>Aquifex</i> <i>Sulfolobus</i> <i>Acidianus</i> <i>Metallosphaera</i>
$\text{S}^0 + 3\text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{H}_2\text{SO}_4$	<i>Aquifex</i> <i>Sulfolobus</i>
$2\text{FeS}_2 + 7\text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O} \longrightarrow 2\text{FeSO}_4 + 2\text{H}_2\text{SO}_4$	<i>Acidianus</i> <i>Metallosphaera</i>
$\text{NO}_3^- + \text{FeCO}_3 + 5\text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{NO}_2^- + 2\text{Fe(OH)}_3 + \text{HCO}_3^- + 2\text{H}^+$	<i>Ferroglobus</i>

Fuente: HUBER, R. et al. 1998.

Realizado por: SORIA, Arturo. 2015.

Otras maneras de supervivencia de este tipo de microorganismos se da por; la oxidación de azufre elemental o hierro (aeróbicamente) por la especies de *Sulfolobus*, y la oxidación de hidrogeno

molecular o hierro conjuntamente con la reducción de NO_3^- , produciendo en primer lugar NO_2^- y después NO_2 y NH_4^+ .

Dentro de la respiración anaerobia podemos encontrar otros aceptores de electrones, tanto de origen inorgánico como; nitrato (NO_3^-), ion férrico (Fe_3^+), ion sulfato (SO_4^{2-}), y Carbonato, así como también compuestos orgánicos como; Selenato, Arseniato, Oxido de trimetilamina, glicina y cisteína. Por lo general la mayoría de estos microorganismos tienen sistemas de transporte de electrones con citocromos, quinonas, proteínas con hierro y azufre. (**MADIGAN M., et al.** 2000.)

Los compuestos aceptores de electrones más comúnmente usados en la respiración anaerobia que se originan en la naturaleza por procesos químicos inorgánicos son; amoníaco, nitrato, nitrógeno gaseoso. (**WAGNER M., et al.** 1998.)

El anhídrido carbónico es usado como aceptor de electrones por microorganismos procariotas dentro de los cuales se los incluye a los metanógenos pertenecientes al dominio Archaea, que son capaces de producir metano partiendo del hidrogeno molecular. (**STAMS, A.** 1994.)

Los metales como; Hierro (Fe_3^+), Cobalto (Co_3^+), Manganeseo (Mn_4^+) y Selenio (Se_4^+) también son usados como aceptores de electrones por estos microorganismos. En los sistemas termales tenemos como aceptores de electrones a componentes que están ligados a ciclos biogeoquímicos es decir a compuestos azufrados oxidados. (**SLOBODKIN A., et al.** 1997.)

1.2.3.5. Mecanismos de supervivencia a altas temperaturas.

Los microorganismos son capaces de sobrevivir en temperaturas altas gracias al tipo de estructura, metabolismo y función celular de cada uno de sus componentes. (**SLOBODKIN A., et al.** 1997.)

1.2.3.5.1. Lípidos.

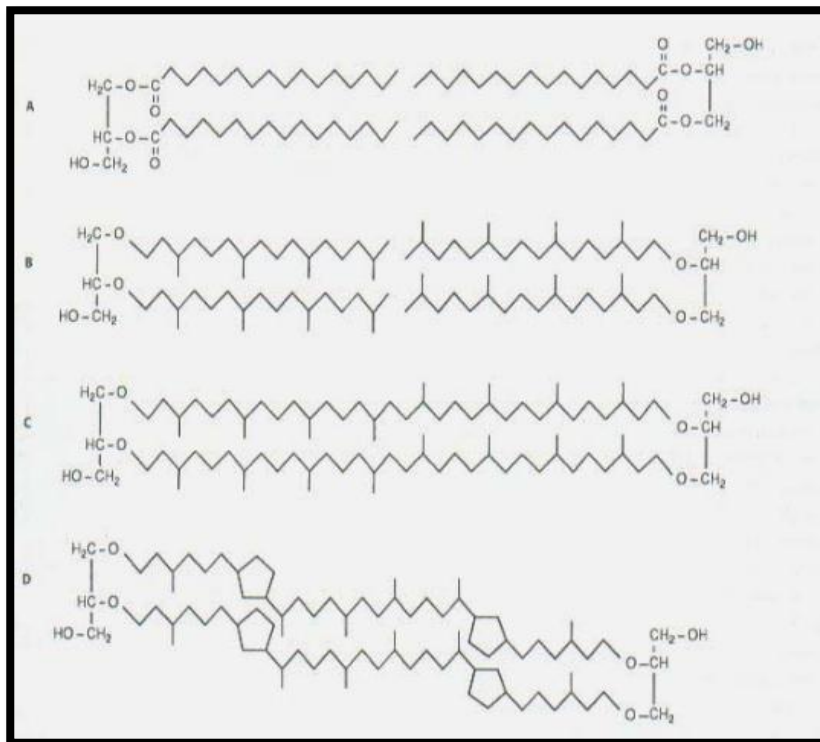
La membrana celular de los organismos termófilos, está constituida por gran porcentaje de ácidos grasos insaturados, estos tienen un punto mayor de fusión al de los organismos mesófilos. Estos microorganismos tienen la capacidad de regular el porcentaje de ácidos grasos y lípidos proporcionalmente con la temperatura del medio en el que se desarrollan, esta acción les permite contar con una membrana celular muy flexible y estabilidad térmica. (**PEDROZA, A.** 2001.)

Las principales funciones de los ácidos grasos de la membrana celular es brindar un ambiente hidrofóbico y mantener rígida a la célula, en los microorganismos hipertermófilos como los Archaeas generalmente existen cadenas de hidrocarburos isoprénicos ramificadas que se unen al glicerol mediante enlaces éter. Por otro lado en algunos Archaeas, existen membranas bicapas compuestas por moléculas diéter glicerol fitanil.

En la bicapa las fuerzas hidrofóbicas mantienen unidos a sus componentes, mientras que los enlaces éter y las ramificaciones de hidrocarburos incrementan la resistencia a las temperaturas altas del medio. (SLOBODKIN A. et al. 1997.)

Los organismos termófilos pueden presentar diferentes tipos de estructuras en su membrana celular fig. 3, así tenemos; (ATLAS, R. & BARTA R. 1998.)

Ilustración 3 – 1. Estructuras de los microorganismos termófilos.



Fuente: ATLAS, R. & BARTA R. 1998.

Realizado por: SORIA, Arturo. 2015

- A. Bicapa de diéter glicerol ácido esteárico que permanecen unidas gracias a las fuerzas hidrofóbicas.
- B. Bicapa de diéter glicerol fitanilo, la estabilidad térmica crece proporcionalmente con la longitud de la cadena de hidrocarburos.

- C. Monocapa de tetraéter diglicerol bifitanilo que presenta gran estabilidad al calor.
- D. Tetraéter diglicerol que incorpora dos anillos pentacíclicos por cadena.

1.2.3.5.2. *Síntesis celular rápida.*

Los microorganismos termófilos producen proteínas termoestables, resistentes a la desnaturalización y proteólisis, éstas se llaman Chaperoninas, que tienen la capacidad de replegar las proteínas a su forma nativa y restaurar sus funciones luego de que hayan sufrido la desnaturalización. (HAKI, G., & RAKSHIT S. 2003.)

1.2.3.5.3. *Macromoléculas termoestables.*

Estos microorganismos presentan un contenido elevado de guanina-citosina en su ADN, esto hace que exista alta cantidad de puentes de fusión así como también mayor estabilidad en las moléculas de ácidos nucleicos. El ARN de transferencia tiene gran estabilidad, la misma que crece gracias a modificaciones que pueden darse en su estructura. (STETTER, K. 1999.)

1.2.3.5.4. *Extremoenzimas.*

La presencia de estas enzimas extremas hace que se den cambios en los residuos de aminoácidos específicos, se incrementen los enlaces iónicos, interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrogeno, puentes disulfuro y enlaces metálicos. En el cuadro 5 se muestran los 3 tipos de Extremoenzimas existentes; (DEMIRJIAN, D., et al. 2001.)

Cuadro 5-1. Clasificación de las Extremoenzimas.

Tipos de extremoenzima	Características
Clase I	Estables a 55-65 °C. Inactivas a Temperaturas Superiores.
Clase II	Inactivas a temperaturas de síntesis y activas con substrato.
Clase III	Estables a temperaturas superiores a las de síntesis.

Fuente: DEMIRJIAN D., et al. 2001.
Realizado por: SORIA, Arturo. 2015

1.3. Cantón Baños de Agua Santa.

Está ubicado en la serranía ecuatoriana, a este cantón también se lo conoce como “Puerta del Dorado” o “Refugio de las Cascadas”, posee un clima maravilloso, aguas termales que brotan desde las profundidades del volcán Tungurahua, orquídeas, aves de colores, aventuras inigualables y los alfeñiques. (BALDOCK, J. 1982.)

1.3.1. Datos Generales.

El cantón Baños de Agua Santa posee un área de 1073.5 km², ubicada a 1820 m.s.n.m. El 95% de ingresos económicos es generado por el turismo por lo que se ha convertido en el cuarto destino turístico más visitado especialmente por turistas extranjeros en el Ecuador. (BALDOCK, J. 1982.)

1.3.2. Antecedentes Geográficos.

- *Ubicación Geográfica.*

La ciudad de Baños está asentada a 1820 msnm, en los flancos externos de la cordillera oriental de los Andes, al pie del volcán Tungurahua. Presenta una enorme riqueza hídrica, al oeste tiene el río Bascún, al oriente el río Ulba y al sur el río Pastaza.

- Latitud: 02°55’ S
- Longitud: 079°04’ O

Está delimitada: al norte; Napo, al sur; Chimborazo y Morona Santiago, al este; Pastaza y al oeste los cantones de Patate y Pelileo. (HERRERA, J. 1995.)

- *Clima*

Es templado con una temperatura media de 18°C. Según la Estación Meteorológica la precipitación medial anual fluctúa en alrededor de los 1500 mm. (HERRERA, J. 1995.)

1.3.3. *Inventario de Atractivos Turísticos.*

Cuadro 6-1. Inventario de lugares turísticos de Baños de Agua Santa

Categoría	Tipo	Subtipo	Dirección
Sitios naturales	Montañas	Altas montañas	Tungurahua
		Cordilleras	Llanganates
		Volcanes	Tungurahua, cerro hermoso
		Colinas	Cerro hermoso, Igualata
		Valles	Baños
	Ríos	Manantial o fuente	El Salado, La Virgen
		Rápidos o Raudales	Patate, Chambo y Paztasa
		Cascadas	Pailon del Diablo, Manto de la novia, de la Virgen
	Aguas Subterráneas	Aguas Termales	De la Virgen, Salado, Santa Ana, Las Peñas.
Manifestaciones Culturales	Historicas	Arquitectura Religiosa	Basilica de la Virgen de Agua Santa
		Museos Religiosos	Virgen de Agua Santa
	Etnografía	Comidas y Bebidas Típicas	Guarapo, Sanduche, Melcochas.

Fuente: GUIA OFICIAL DE TURISMO. (2001)

Realizado por: SORIA, Arturo. 2015.

1.3.4. *Fuentes Termominerales de la Virgen.*

Estas termas son aguas sulfatadas, ubicadas al pie de la Cascada Cabellera de la Virgen. La temperatura del agua es de 54°C. Está compuesta por trazas de: Calcio, sodio, magnesio, sílice, potasio, azufre, anhídrido carbónico y otros minerales. Los turistas se bañan en estas aguas con el fin de tratar patologías como: Reumatismos, varicosis, padecimientos del hígado, del estómago, lesiones cutáneas, desequilibrios metabólicos, entre otras. (INAMHI, 2012).

Según el inventario del INAMHI en el 2012, en las termas de “La Virgen” son hipertermales, sulfatadas magnésicas, estas características se detallan a continuación se detallan a continuación;

- *Información General.*

Cuadro 7-1. Información general de la terma “Virgen 1”.

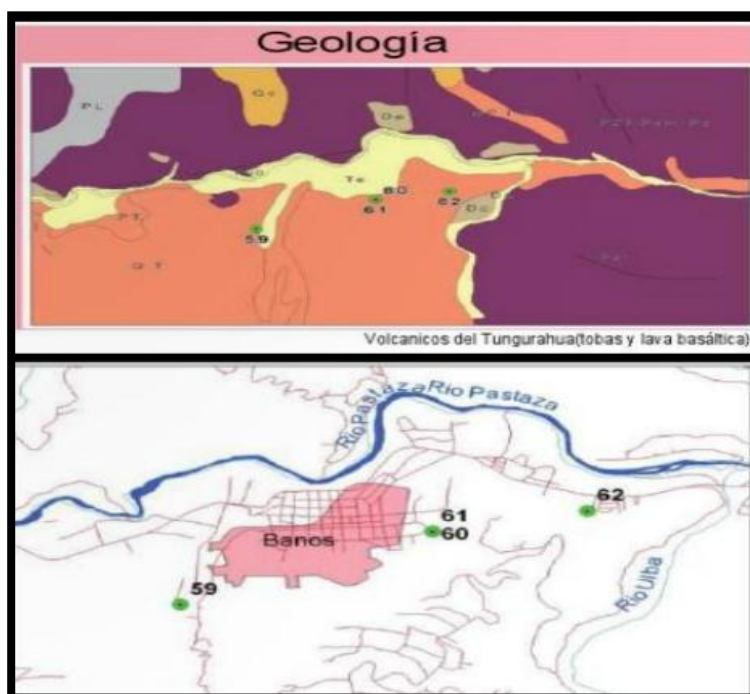
INAMHI INVENTARIO FUENTES TERMOMINERALES DEL ECUADOR INFOMACION BÁSICA					
Cuenca:	Pastaza	H. Topgraf.	Baños	Localidad:	Baños (La Virgen) # 1
Provincia	Tungurahua	ESTE (UTM)	787400	Propietario:	Municipio de Baños
N°:	60	NORTE (UTM)	9845225	Fecha:	20/07/2012
Tipo:	V. Hipertermal	Elevación	1832	Uso:	Recreación
		Proyección	WGS 84	Zona:	17 S

Fuente: INAMHI. 2012.

Realizado por: SORIA, Arturo. 2015

- *Ubicación:*

Ilustración 4 – 1. Geología y ubicación de las termas la Virgen.



Fuente: INAMHI. 2012.

Realizado por: SORIA, Arturo. 2015

Ilustración 5 - 1: Fuentes de “La Virgen 1”.



Fuente: SORIA, Arturo. 2015

- *Balace iónico y propiedades físicas.*

Cuadro 8-1. Balace iónico y propiedades físicas de las termas “La Virgen 1”.

BALANCE IONICO					
ANION	mg/l	CATION	mg/l	OTRAS DETERMINACIONES	
CO ₃ H-	1294,00	Na+	428,75	Parámetros	
CO ₃ =	0,0	K+	72,60	pH	7,5
SO ₄ =	2198,0	Ca ⁺⁺	79,30	CE (µs/cm)	5090
Cl-	406,97	Mg ⁺⁺	492,7	DUREZA (mg/l)	2225
NO ₃ -	0,49	NH ₄ ⁺	0,215	TEMPERAT (°C)	52,80
NO ₂	<0,05	Fe=	2,872		
PO ₄ =	<0,5				
OTRAS DETERMINACIONES					
Turbidez	64		Cobre	<0,25	
Color	114		Cromo	<1	
Alcalinidad	1294		Plomo	<1	
STD	3293,23		SiO ₂	183,2	
CO ₂	83,5		Mn	0,168	
OBSERVACIONES:					
TIPO DE AGUA					
SULFATADA MAGNESICA					
HIPERTERMAL					

Fuente: INAMHI. 2012.

Realizado por: SORIA, Arturo. 2015

CAPITULO II

2. METODOLOGIA.

2.1. Toma de muestra.

2.1.1. *Tipo de muestras.*

El tipo de muestra y la profundidad de donde se la tome son datos que deben ir registrados en la ficha. Tanto para el análisis químico y microbiológico deben usarse muestras propias para cada análisis debido a que su muestreo, la manipulación y los equipos son diferentes. Los diferentes tipos de muestras son:

Muestra simple; se usan para un análisis individual. En aguas subterráneas solo se deben tomar en un único punto y nivel acuífero.

Muestra selectiva en profundidad; obtenida de un acuífero de profundidad conocida.

Hay que diferenciar entre muestra de selectiva en profundidad y muestra tomada a profundidad conocida, en el primer caso conocemos la profundidad a la que fue tomada la muestra y en el segundo se sabe el nivel pero puede estar mezclada con agua de otros niveles. (**LÓPEZ GETA, J.** 1986.)

2.1.2. *Cantidad de Muestra.*

Numero de muestras; normalmente se toma una sola muestra. Cuando se requiera un estudio legal se tomara las muestras que la norma especifique que generalmente son 3 o más (una para el laboratorio, la segunda para las determinaciones y la tercera para el organismo responsable del muestreo que quedara durante un tiempo (mayor a 6 meses), esto debido a posibles reclamos.

Volumen de muestras; estará en dependencia de las necesidades del laboratorio analista, de acuerdo a las determinaciones a llevar a cabo y del procedimiento analítico utilizado. (**LÓPEZ GETA, J.** 1986.)

2.1.3. *Preparación del muestreo.*

Para el análisis de aguas subterráneas primero hay que adecuar los materiales y los equipos. La técnica a llevar a cabo debe incluir; (**LÓPEZ GETA, J.** 1986.)

- Registro de campo.
- Dispositivos para medir los niveles.
- Medidores de pH, conductividad, potencial redox, oxígeno disuelto, termómetro.
- Materiales que permitan filtrar el agua.
- Recipientes para la toma y el transporte del agua.
- Material de higiene y seguridad personal.

2.1.4. *Selección de envases.*

Características: deben garantizar el mantenimiento de las características autóctonas de las muestras. Es decir; (**LÓPEZ GETA, J.** 1986.)

- No desprender ningún tipo de materia que pueda alterar el agua.
- El material del que este hecho el recipiente no debe reaccionar con los constituyentes del agua.
- Los recipientes usados para muestras a utilizar en análisis microbiológicos deben ser totalmente estériles y libres de sustancias que inhiban o potencien el crecimiento bacteriano.
- Debe proporcionar un cierre hermético

Material del envase: no debe interactuar con la muestra.

Vidrio: el vidrio sódico puede disolverse lo que provocaría un aumento de concentración de Na y Si en la muestra. El vidrio borosilicato (pírex) suelen desprender cantidades apreciables de Mg, Pb, Zn, Ar. Otros vidrios pueden absorber y resorber fosfatos.

Plástico; el plástico generalmente desprende material orgánico que interfiere en ciertos análisis como los de plaguicidas. Otros envases como los de propileno son porosos por lo que provocan pérdidas por evaporación. Algunos envases de plásticos son permeables a gases y la mayoría al dióxido de carbono. (LÓPEZ GETA, J. 1986.)

Cuadro 9-2. Tipo de material de envase para recolectar muestras.

Parámetro	Recipiente	Conservante	Tiempo máx.	Observaciones
Alcalinidad Acidez	Plástico o vidrio	Refrigeración	24 horas	Preferible determinación in situ
Amonio	Plástico o vidrio	Refrigeración	6 horas	
Arsénico	Plástico o vidrio	pH<2	1 mes	
DBO	Plástico o vidrio. El vidrio es preferible en casos de DBO baja.	Refrigeración	24 horas	Mantener en la oscuridad
Calcio	Plástico o vidrio		24 horas	Hasta 48 horas pero debe tenerse cuidado con muestras que presenten un CE>70 mS/cm
		pH<2	1 mes	La acidificación (no usar SO ₄ H ₂) permite determinar el calcio en la misma muestra que otros metales.
Cianuro	Plástico	Refrigeración. NaOH a pH>12, 0.6 g de ácido ascórbico.	14 días	El método de conservación dependerá del método de análisis
Cloruros	Plástico o vidrio		1 mes	
Color	Plástico o vidrio	Refrigerar	24 horas	Almacenar en la oscuridad. Preferible hacerlo in situ
Conductividad	Plástico o vidrio	Refrigerar	24 horas	Almacenar en la oscuridad. Preferible hacerlo in situ
Dureza	Plástico o vidrio		24 horas	Preferible realizarlo lo antes posible, pues puede ocurrir precipitación de carbonatos.
		pH<2	1 mes	La acidificación permite determinar el calcio y magnesio en la misma muestra que otros metales.
DQO	Plástico o vidrio. El vidrio es preferible en caso de baja DQO.	pH<2 con SO ₄ H ₂ ., Refrigerar		Almacenar en oscuridad
Fluoruros	Plástico		1 mes	No emplear PTFE

Fuente: LÓPEZ GETA, J. 1986.

Realizado por: SORIA, Arturo. 2015.

2.1.5. *Condiciones de conservación para cada parámetro a analizar.*

Cuadro 10-2. Condiciones de almacenamiento de muestras.

Parámetro	Recipiente	Conservante	Tiempo máx.	Observaciones
Metales disueltos	Plástico o vidrio	Filtrar y acidificar a pH<2	1 mes	Excepto mercurio
Metales totales	Plástico o vidrio	Acidificar a pH<2	1 mes	Excepto mercurio
Mercurio total	Plástico o vidrio	pH<2 con HNO ₃ y adición de K ₂ Cr ₂ O ₇ hasta una concentración final del 0,05%	1 mes	Debe tenerse un especial cuidado en que los recipientes para la toma de muestra no estén contaminados
Nitrato	Plástico o vidrio	pH<2 o refrigeración. Filtrado a 0.45 μ y refrigeración	24 horas 48 horas	Si no se analiza en el tiempo requerido, añadir bactericida como el timol (Note que el NO ₃ ⁻ puede formar NH ₄ ⁺ en ambientes reductores)
Nitrito	Plástico o vidrio	Refrigeración	24 horas	Si no se analiza en el tiempo requerido, añadir bactericida como el timol (El NO ₂ ⁻ puede descomponerse a sí mismo aún cuando se haya añadido el bactericida).
pH	Plástico o vidrio	Guardar a menor T° que la inicial	6 horas	El pH debe determinarse en el momento de la toma de muestra
Fósforo disuelto	Vidrio borosilicatado o vidrio	Refrigeración tras filtrado inmediato in situ	24 horas	Se recomienda el uso de botellas yodizadas
Fósforo total	Vidrio borosilicatado o vidrio	Refrigeración pH<2 con H ₂ SO ₄	24 horas 1 mes	Se recomienda el uso de botellas yodizadas
Potasio	Plástico		1 mes	
Sodio	Plástico		1 mes	
Sulfatos	Plástico o vidrio	Refrigeración	1 semana	En aguas residuales añadir peróxido de hidrógeno para evitar la formación de sulfuro de hidrógeno
Parámetro	Recipiente	Conservante	Tiempo máx.	Observaciones
Sulfuros	Plástico o vidrio	Alcalinizar con carbonato de sodio y fijar con acetato de cinc		Analizar lo antes posible. De ser posible hacerlo en el campo, en este caso no requiere preservación
Turbidez	Plástico o vidrio		24 horas	La determinación debe hacerse preferentemente in situ

Fuente: LÓPEZ GETA, J. 1986.
Realizado por: SORIA, Arturo. 2015.

2.1.6. **Obtención de la muestra.**

En el balneario de “La Virgen” las muestras de agua para el análisis se las tomó, del ojo de agua y de la piscina con bañistas inmersos en ella, el muestreo en el ojo fue simple y directo, mientras que el muestreo de la piscina fue selectivo en profundidad, es decir en las cuatro esquinas y el centro de la piscina a 40 cm aproximadamente de profundidad. El muestreo se realizó directo y por duplicado, en la Provincia de Tungurahua, ciudad de Baños, Parroquia Matriz, con la ayuda del Tutor y Colaborador del proyecto de tesis. (ANEXO A)

Las muestras se las recogió en envases estériles de plástico con un volumen aproximado de 200 mL. Los frascos se transportaron el mismo día de su recolección en porta muestras con geles refrigerados inmersos en él (ANEXO B). Una vez las muestras de las termas de la “Virgen” en el laboratorio se empezaron con el análisis como se muestra en los esquemas de la Ilustraciones 6-2 y 7-2.

2.2. **Pruebas in situ.**

Estas pruebas se las realizo con la máxima asepsia posible, se midió tanto en el ojo así como también en la piscina, se evaluó directamente los siguientes parámetros; temperatura, pH, solidos totales y conductividad con un multiparámetro Hanna Modelo HI98129 al que se le calibro previo a la medición. Todas las mediciones se las realizo por duplicado obteniendo una media entre ellas (ANEXO C).

2.3. **Placas Petrifilm.**

Son métodos oficiales de análisis (OMA) reconocidos por la AOAC internacional (Asociation of Official Analytical Chemist), contienen adhesivos, películas y nutrientes que permiten realizar pruebas microbiológicas de manera rápida, fácil, precisa y reproducible. (MICROBIOLOGÍA, 3M. 2014.)

Son ampliamente utilizadas en pruebas de control de calidad tanto en laboratorios de alimentos, clínicos y de farmacia. El análisis se lleva a cabo en tres etapas:

- *Siembra:* se añade la muestra previamente preparada levantando la película de la placa Petrifilm.

- *Incubación:* la temperatura va en dependencia del microorganismo pero siempre permite ahorrar espacio.
- *Contaje:* de acuerdo a la coloración que tomen los indicadores la placa se lee muy rápidamente. (AOAC. 2012)

2.3.1. *Siembra en Petrifilm, repique y aislamiento de colonias puras en agar Müller Hilton.*

La siembra se realizó inoculando 1mL de muestra en cada Petrifilm, luego de un minuto aproximadamente se incubo 37°C, la lectura y conteo de colonias se hizo después de 24-48 horas. Después se procedió a tomar 2 o 3 colonias morfológica y físicamente iguales y se repico en Agar Müller Hilton una vez por día, hasta unas 5 repeticiones. Finalmente se sembró por agotamiento en Agar Müller Hilton, se incubo por 24 horas y se tomó colonias aisladas para repicar en placas con el mismo Agar, así se obtuvo colonias puras, estabilizadas y aisladas. (ANEXOS D & E).

2.3.2. *Placas Petrifilm para recuento de coliformes.*

Estas placas están preparadas con nutrientes de Bilis y de Rojo Violeta, agente gelificante hidrosoluble, indicador para glucoronidasa y el indicador de tetrazolio que facilita la lectura de las colonias mediante la producción de gas y la aparición de color rojo azulado. (APHA. 2012). En nuestra investigación luego de inocular 1 mL de muestra a estas placas se incubaron invertidas por 48 horas a una temperatura de 35° C, obteniendo así colonias con morfologías pronunciadas.

2.3.3. *Placas Petrifilm para recuento de Staphylococcus aureus.*

Este medio corresponde a un medio de cultivo cromogénico Baird Parker selectivo y que diferencia a los *Staphylococcus aureus* del resto de su grupo, generalmente se presentan como colonias de color rojo-violeta, a veces las colonias no presenten color rojo-violeta propiamente dicho, en tal caso se debe usar un disco que contiene azul-O toluidina el cual facilita la visualización de las colonias debido a que forma un halo después de las 24 horas de haber pasado en incubación con una temperatura de 35°C. (AOAC. 2012).

El tiempo de incubación posterior a la inoculación en nuestro trabajo fue de 36 horas a una temperatura de 35° C.

2.3.4. *Placas Petrifilm para recuento de aerobios.*

Este medio está compuesto de nutrientes que contiene el agar Standars Methods, es decir un agente gelificante hidrosoluble y también una tintura roja que colorea a las colonias de color café rojizo ya sea con producción de gas o sin producción de éste. (APHA. 2012). En nuestro trabajo las placas se incubaron durante 24 horas para totales y 36 horas para *E. coli* a una temperatura de 35° C.

2.3.5. *Placas Petrifilm para recuento de levaduras y mohos.*

Esta placa contiene el colorante Rosa de Bengala que facilita el recuento de mohos y levaduras, así como también nutrientes de Sabhi, antibióticos como claranfencol y clorotetraciclina, indicador de fosfatos identificado por las siglas BCIP, un agente gelificante hidrosoluble, y un tinte que tiñe las colonias de levaduras de color verde azuladas, generalmente son pequeñas, con bordes definidos y con foco central.

Mientras que las colonias de mohos son grandes de coloración variada, sus bordes son difusos y con foco central. (MICROBIOLOGIA, 3M. 2014.) En nuestros análisis la temperatura de incubación fue 35° C por un tiempo de 7 días, posterior a lo cual se procedió a realizar el conteo y diferenciación de colonias tanto de mohos como de levaduras.

2.4. **Pruebas de catalasa y oxidasa.**

Catalasa.

Esta prueba pone en evidencia la presencia de la enzima catalasa, la cual descompone el peróxido de hidrogeno en agua y oxígeno. Se considera la prueba positiva cuando al poner en contacto la bacteria con el agua oxigenada (al 30%) existe el desprendimiento de gas. Esta prueba es positiva para la mayoría de bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocromo. (MAC FADDIN. 2003.)

Se depositó una gota de agua oxigena en el porta objetos para cada una de las bacterias aisladas. Después se suspendió cada una de las bacterias y observamos si hay o no formación de burbujas, de haberlo la prueba se reportó como positiva. (ANEXO H).

Oxidasa

Esta prueba utiliza discos con N, N,N,N-tetrametil-p-fenilendiamina. Se basa en la producción de una enzima oxidasa intracelular debido a la presencia de la citocromo oxidasa. Los colorantes de p-fenilendiamina son aminas aromáticas primarias, diamino del benceno, el citocromo oxidasa oxida al citocromo C que a su vez oxida al reactivo, la fenilendiamina es metilada, mientras más grupos metilados se introducen en el radical amino el color es más azul.

La prueba se considera positiva cuando la coloración de las tiras cambia a azul marino. (**MAC FADDIN**, 2003.). A las colonias aisladas puras y activadas se les puso en contacto con la tira con N, N, N, N-tetrametil-p-fenilendiamina. Se reportó como positiva a las colonias que tiñeron de morado-azulado las tiras reactivas (ANEXO H).

2.5. **Tinción Gram**

Es una tinción que permite separar a las bacterias en dos grupos: Gram positivas y Gram negativas, en dependencia de que si luego de la decoloración retienen o no el colorante cristal violeta. Las bacterias que retienen toman una coloración azul oscuro o violeta y corresponden a las Gram positivas, mientras que las que no retienen el cristal violeta se tiñen del colorante secundario (safranina) tiñéndose de rojas y corresponden a las Gram negativas. (**VIZCARRODO, A. & GUTIERREZ, S.** 2008.)

Se fijó (cepa con solución salina) cada una de las bacterias aisladas, luego se colocó los reactivos en el orden que sigue; cristal violeta, lugol, alcohol/acetona y safranina. Después de cada adición se lavó con agua potable después de un minuto con excepción del alcohol/cetona que se lavó después de 30 segundos de haberla adicionado a la placa. Se esperó que seque y se observó con el lente de 100x en el microscopio (ANEXO F & G).

2.6. **Pruebas; movilidad (MIO) y de oxidación/fermentación (O/F).**

- *Movilidad*

Se siembra por picadura en agar Movilidad Indol Ornitina (MIO), se incuba a una temperatura de 30°C por un tiempo de 48 horas. La prueba es positiva si el crecimiento sobrepasa la línea sembrada. (**BARROW, G. & FELTHAM, R.**1993.)

La composición de este agar es:

Cuadro 11-2. Composición del agar de movilidad.

Extracto de carne	3.0 g
Peptona	10.0 g
Cloruro Sódico	5.0 g
Agar	4.0 g
Agua	1000,0 mL

Fuente: BARROW, G. & FELTHAM R. 1993.

Realizado por: SORIA, Arturo. 2015.

Esta prueba se aplicó solo a las colonias identificadas como Bacilos Gram negativas. Se sembró por picadura en agar Movilidad Indol Ornitina, la incubación se realizó a una temperatura de 35°C durante 48 horas, transcurrido este tiempo se leyó, la prueba se reportó como positiva a los tubos en los que apareció un enturbiamiento o crecimiento más allá de la línea de siembra (ANEXO J) .

- *Oxidación/Fermentación.*

Prueba que determina el metabolismo oxidativo o fermentativo de un hidrato de carbono. La prueba se realiza por duplicado en dos tubos con agar Hugh-Leifson, el primer tubo queda sin cubrirse, mientras que el segundo se lo recubre con parafina líquida estéril. Se incuban a 30°C por 72 horas.

Las bacterias oxidativas producen ácido solo en el tubo abierto expuesto al oxígeno atmosférico; los microorganismos fermentadores producen ácido en los dos tubos, las bacterias no sacarolíticas son inertes y mantienen un pH alcalino. La interpretación de resultados se realiza de la siguiente manera: O/F; amarillo/amarillo = fermentativo facultativo, Amarillo/Verde = oxidativo, Verde/Amarillo = fermentador estricto, Azul/Azul = no fermentador. (MAC FADDIN. 2003.)

La composición de este medio es;

Cuadro 12-2. Composición medio básico Hugh Leifson.

Triptona	2,0 g
Cloruro Sódico	5,0 g
Fosfato dipotásico	0,3 g
Agar	3,0 g
Agua destilada	1000,0 mL

Fuente: BARROW, G. & FELTHAM, R. 1993.

Realizado por: SORIA, Arturo. 2015

A todos los organismos Gram Negativos se los sembró con pipeta Pasteur en dos tubos con medio de Hugh-Leifson u O/F, el primero se lo dejó sin recubrir, mientras que el segundo se le recubrió con una capa de vaselina previamente esterilizada. La lectura se realizó a las 72 horas, finalmente se interpretó los resultados de la siguiente manera O/F: amarillo/amarillo = fermentativo facultativo, Amarillo/Verde = oxidativo, Verde/Amarillo = fermentador estricto, Azul/Azul = no fermentador o inerte.

2.7. Pruebas de hidrólisis: almidón y gelatina.

- *Almidón*

Esta prueba usa agar almidón, se realiza siembra por picadura, la inoculación es a 30°C por el lapso de 8 días, si la colonia es abundante se añaden gotas de solución de yodo yodurado. La prueba es positiva cuando se forma un halo alrededor de la colonia. (BARROW, G. & FELTHAM, R. 1993.)

La formulación del Agar Almidón es;

Cuadro 13-2. Composición Agar Almidón.

Extracto de carne	3.0g
Almidón Soluble	10.0 g
Agar	12,0 g
Agua destilada	1000.0 mL.

Fuente: BARROW, G. & FELTHAM, R. 1993.

Realizado por: SORIA, Arturo. 2015.

En medio Agar Almidón se inoculó todos los microorganismos Gram positivos. Se incubó a 35°C por un lapso de 8 días, cuando la colonia se haya desarrollado apreciablemente se añaden unas gotas de solución yodo yodurado. Todas las colonias que presentaron un halo transparente se reportó como positiva (ANEXO I).

- *Gelatina.*

Para esta prueba se realiza un repique en agar gelatina, se incubó a 30°C por un lapso de 8 días, cuando la colonia es abundante se agregan gotas de cloruro mercurico. La prueba es positiva al producirse una zona clara alrededor de la colonia. (BARROW, G., & FELTHAM, R. 1993.)

La formulación para preparar Agar Gelatina es:

Cuadro 14-2. Composición medio gelatina.

Extracto de carne	3.0g
Gelatina	30.0 g
Agar	12,0 g
Agua destilada	1000.0 mL.

Fuente: BARROW, G. & FELTHAM R. 1993.

Realizado por: SORIA, Arturo. 2015

A todos los organismos Gram positivos se los inoculo en placas con Agar Gelatina. Se los incubo a 35°C por un lapso de 8 días, cuando se observó una colonia apreciable se añadió gotas de solución de cloruro mercuríco. A las colonias que formaron un halo apreciable se las reporto como positiva (ANEXO I).

2.8. Pruebas confirmatorias.

2.8.1. *Crecimiento en agar Manitol Salado.*

Este agar tiene utilidad en el aislamiento selectivo de *S. aureus* y *Staphylococcus* en muestras clínicas, posee peptonas y extractos de carne bovina que proporciona los nutrientes esenciales, así como también cloruro de sodio (7.5%) que inhibe el crecimiento de microorganismos diferentes a *Staphylococcus*.

Los *Staphylococcus* coagulasa positivos producen colonias amarillas con fermentación del medio circulante del mismo color (*S. aureus*), mientras que los coagulasa negativos producen colonias rojas sin fermentación. (CHAPMAN, G.1945.)

La formulación (g/L) es;

Cuadro 15-2. Composición medio agar Manitol Salado.

Extracto de carne bovina	1,0 g
Digerido pancreático de caseína	5,0
Digerido péptico de tejido animal	5,0
Cloruro sódico	75,0
D-manitol	10,0
Rojo fenol	0,025
Agar	15,0
pH 7,4 ± 0,2	

Fuente: CHAPMAN, G. 1945.

Realizado por: SORIA, Arturo. 2015.

Las colonias de bacterias diferenciadas como *Staphulococcus* se las sembró por agotamiento en medio Agar Manitol Salado, se las incubo por 24-48 horas a 35°C y se realizó la lectura, identificando crecimiento y fermentación por el viraje de color del agar a amarillo (ANEXO K).

2.8.2. Pruebas bioquímicas para la diferenciación de enterobacterias.

- *Kligler Hierro Agar:*

Este medio está compuesto por peptona de carne y tripteína las que proporcionan nutrientes adecuados para el desarrollo bacteriano. La lactosa y la glucosa son los hidratos de carbono fermentables. El tiosulfato de sodio es el sustrato necesario para la producción de ácido sulfhídrico, el citrato de hierro y amonio, es la fuente de iones Fe^{3+} , los cuales se combinan con el ácido sulfhídrico y producen sulfuro de hierro el mismo que es de color negro.

El rojo de fenol es el indicador de pH y el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico. El agar es el agente solidificante. Por fermentación de azúcares se producen ácidos que se detectan por medio del indicador rojo de fenol, el cual produce un viraje al color amarillo en medio ácido. El tiosulfato de sodio gradualmente se reduce a sulfuro de hidrógeno el que reacciona luego con una sal de hierro para proporcionar el típico sulfuro de hierro que tiene un color negro. (CHAPMAN, G.1945.)

La formulación (g/L) para preparar Agar Kligler Hierro es;

Cuadro 16-2. Composición medio agar Kligler Hierro.

PEPTONA DE CARNE.....	13.0
CLORURO DE SODIO.....	5.0
LACTOSA.....	10.0
TRIPTEÍNA.....	10.0
GLUCOSA.....	1.0
CITRATO DE HIERRO Y AMONIO.....	0.5
TIOSULFATO DE SODIO.....	0.3
ROJO DE FENOL.....	0.025
AGAR.....	15.0
pH FINAL: 7.3 ± 0.2	

Fuente: KLIGLER, I. 1917.

Realizado por: SORIA, Arturo. 2015.

Interpretación de resultados: se debe observar el color del medio y la existencia de producción de gas o no: (KLIGLER, I. 1917.)

- Superficie alcalina/profundidad ácida (pico rojo/fondo amarillo): solamente fermenta la glucosa.
- Superficie ácida/profundidad ácida (pico amarillo/fondo amarillo): fermenta glucosa, y lactosa.
- Superficie alcalina/profundidad alcalina (pico rojo/fondo rojo): no fermenta azúcares.
- Presencia de burbujas o la ruptura del medio de cultivo indican que producción de gas.
- Ennegrecimiento del medio indica que el microorganismo produce ácido sulfhídrico.

Con la ayuda de una aguja de inoculación se sembró picando el fondo y extendiendo en la superficie del medio las colonias aisladas e identificadas como Bacilos Gram negativas. Se incubo a 37°C, por 24 horas y en condiciones de aerobiosis. Finalmente de leyó e interpreto los resultados de acuerdo con las especificaciones propias de este medio (ANEXO L).

- *Agar Citrato de Simmons:*

En este Agar el fosfato de amonio brinda nitrógeno, el magnesio es un cofactor en varias reacciones metabólicas, el fosfato es un buffer, el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico y el agar actúa como agente solidificante. Si se observa un cambio de color de verde a azul la reacción es positiva.

La formulación del Agar Citrato de Simmons es:

Cuadro 17-2. Composición medio agar Citrato Simmons.

Fosfato Dibásico de Amonio	1.0	Sulfato de Magnesio	0.02
Fosfato Dipotásico	1.0	Azul de Bromotimol	0.08
Cloruro de Sodio	5.0	Agar Bacteriológico	15.0
Citrato de Sodio	2.0		
pH	6.9 ± 0.2		

Fuente: SIMMONS, J. 1926.

Realizado por: SORIA, Arturo. 2015.

En el tubo con este medio se colocó un inoculo ligero de las colonias aisladas identificadas como Bacilos Gran negativos en la superficie, se incubo por 24-48 horas a 37 °C y luego se realizó la lectura considerando positiva la prueba que ha cambiado a azul (ANEXO L).

- *SIM Medio:*

En este agar la tripteína y la peptona son los nutrientes, el triptófano es metabolizado por bacterias para formar Indol gracias a un sinnúmero de enzimas llamadas triptofenasa. El Indol se combina con el aldehído del reactivo de Ehrlich de Kovac's para formar un compuesto de color rojo. Los microorganismos son capaces de formar Ácido Sulfhídrico a partir de tiosulfato, el cual al reaccionar con hierro forma un compuesto de color negro.

El agar es el agente solidificante que usado a esa concentración da un medio semisólido, característica que permite evaluar movilidad ya que es visible gracias a un enturbiamiento del medio o por un crecimiento que se difunde más allá de la línea de siembra. (MAC FADDIN, 2000.)

La formulación del agar SIM es:

Cuadro 18-2. Composición medio agar SIM.

FÓRMULA (en gramos por litro)	
TRIPTEÍNA.....	20.0
PEPTONA.....	6.1
SULFATO DE HIERRO Y AMONIO.....	0.2
TIOSULFATO DE SODIO.....	0.2
AGAR.....	3.5
pH FINAL: 7.3 ± 0.2	

Fuente: MAC FADDIN, 2000.

Realizado por: SORIA, Arturo, 2015

Interpretación de resultados: Para la interpretación de las pruebas luego de la incubación se le deben agregar 3-5 gotas de reactivo Indol y se sigue como se muestra en el Cuadro 19-2.

Cuadro 19-2. Interpretación de resultados agar SIM

Prueba	Positiva	Negativa
Movilidad	Turbidez/crecimiento abundante	Crece solo en la línea de siembra
Producción de SH₂	Ennegrecimiento	Mantiene amarillo.
Prueba de Indol	Rojo	Incoloro-amarillento

Realizado por: SORIA, Arturo, 2015

Fuente: MAC FADDIN, 2000.

A las colonias activadas e identificadas como Bacilos Gran Negativos se las sembró por punción profunda y recta en el centro del tubo que contiene este medio, se incubó a 37°C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se le añadió de 3-5 gotas de reactivo de Kovac's, se leyó e interpretó los resultados de acuerdo con las especificaciones propias para este Medio (ANEXO L).

- *Urea Agar Base (Christensen medio).*

Este medio tiene bajo contenido de nutrientes y alta capacidad buffer. El extracto de levadura es fuente de nutrientes esenciales ya que proporciona carbono, nitrógeno, vitaminas y cofactores. Las sales de fosfatos constituyen el sistema buffer, el rojo de fenol es el indicador de pH y la urea es el sustrato de la ureasa.

Las bacterias que contienen ureasa hidrolizan el nitrógeno proveniente de la urea, liberando amoníaco y CO₂ lo que provoca que cambie el indicador rojo fenol del amarillo al rojo. La prueba es positiva cuando el medio se torna rosado-rojizo. (MAC FADDIN. 1985.)

La formulación del Medio Christensen es:

Cuadro 20-2. Formulación del Medio Christensen.

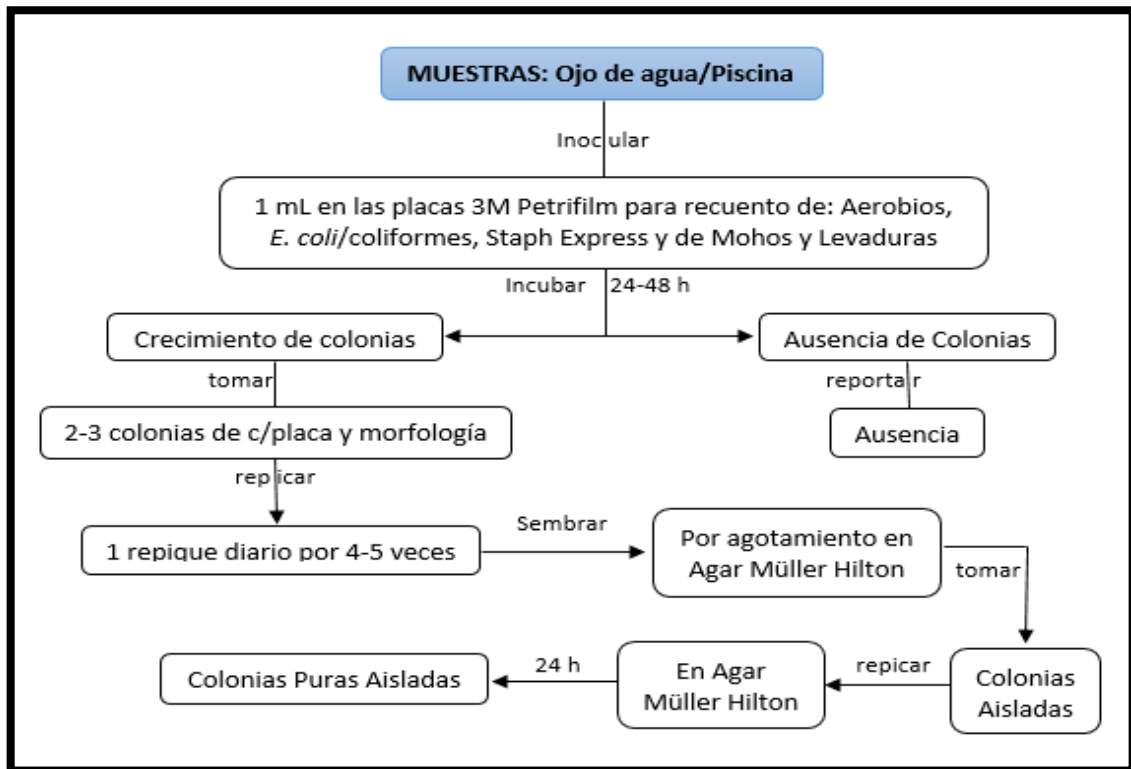
FÓRMULA (en gramos por litro)	
EXTRACTO DE LEVADURA.....	0.1
UREA.....	20.0
FOSFATO MONOPOTÁSICO.....	9.1
FOSFATO DISÓDICO.....	9.5
ROJO FENOL.....	0.01
pH FINAL: 6.8 ± 0.2	

Fuente: MAC FADDIN. 1985.

Realizado por: SORIA, Arturo. 2015

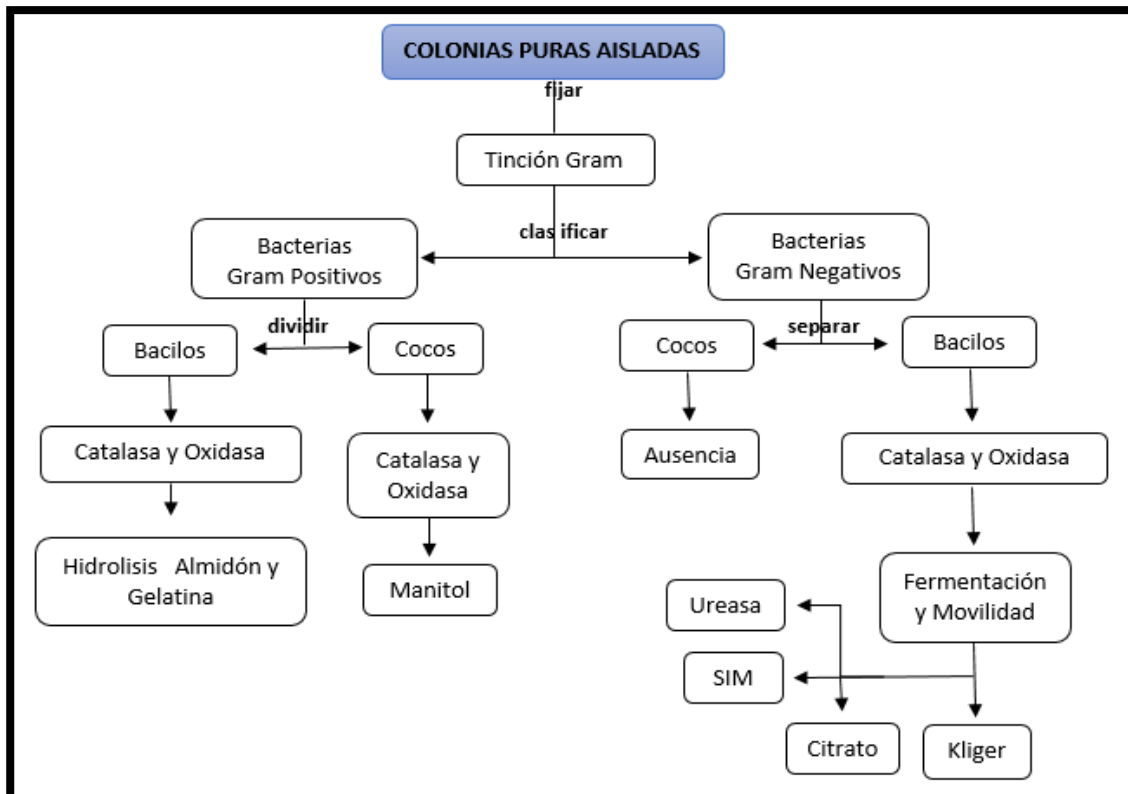
Las colonias aisladas, activadas e identificadas como Bacilos Gram Negativos se las sembró por técnica de estría en la superficie del tubo que contiene este medio. Se incubó por 24-48 horas, a 37°C en condiciones aeróbica. Finalmente se leyó e interpretó los resultados, considerando positivo un viraje de color del medio a Rojo-Rosado (ANEXO L).

Ilustración 6 - 2. Esquema para el aislamiento de colonias puras.



Realizado por: SORIA, Arturo. 2015.

Ilustración 7 - 2. Esquema para la identificación y diferenciación de bacterias.



Realizado por: SORIA, Arturo. 2015.

CAPITULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1. Análisis, interpretación y discusión de resultados.

Los resultados utilizados para el análisis de resultados corresponden a la media aritmética de los valores obtenidos en los muestreos duplicados efectuados tanto en la vertiente como en la piscina del balneario “La Virgen”, con excepción de las características fisicoquímicas debido a que existen estudios solo de las vertientes mas no de la piscina o balneario.

3.1.1. *Características fisicoquímicas.*

En las termas de “La Virgen” con ayuda del multiparámetro Hanna Modelo HI98129 se pudo determinar que tienen un valor medio de temperatura de 51.3° C, dicho valor no difiere notablemente con los estudios realizados por el INAMHI en el 2012 en esta misma vertiente el cual determino un grado calórico de 52.8° C, esta temperatura la clasifica dentro del tipo de aguas Hipertermales las mismas que tienen un origen magmático y grandes propiedades curativas.

Según el INAMHI las vertientes de “La Virgen” son del tipo Sulfatada Magnésica, en nuestro análisis obtuvimos los siguientes valores; pH 7.4, conductividad 3999 uS/cm y Solidos Totales 2000 ppm dichos valores son semejantes a los obtenidos en análisis fisicoquímicos realizados por el INAMHI en el 2012 en los balnearios, “El Salado” y “Santa Ana”, las que también son del tipo Sulfatadas Magnésicas y tienen temperatura 49°C, pH 7.3, conductividad 5685 uS/cm y Solidos Totales 2908 ppm ya que tienen el mismo origen geotermal.

Otros estudios fisicoquímicos realizados por el INAMHI en el 2012 en el Ecuador fueron; en el Balneario de “Cunuyacu” del Cantón Ambato-Tungurahua, en los balnearios “Piedra de Agua” y “Rodas” en Baños de Cuenca-Azuay, donde las vertientes son del tipo Cloruradas Sódicas y presentan valores inferiores a los de “La Virgen”, temperatura media 45°C, pH 7.9, y solidos totales

630ppm, con excepción en la conductividad que es de 4330 uS/cm, esto se debería por la diferente zona geotermal.

En el 2012 el INAMHI también determino que en balneario “Palitagua” de Riobamba-Chimborazo y “Atuchan” Salcedo-Cotopaxi los fangos son del tipo Bicarbonatadas Sódicas las que presentan valores promedio de; temperatura 42° C, pH 7.5, conductividad 2134 uS/cm y solidos totales de 841 ppm, estos valores son inferiores a los obtenidos en nuestro estudio.

De acuerdo con estos datos bibliográficos comprobamos que los valores de pH varia en dependencia de la temperatura y de la concentraciones de iones/minerales disueltos, la cantidad de iones/minerales depende de las rocas y tipos de suelos que recorren las aguas hasta llegar a la superficie, mientras mayor sea la concentración mineral mayores beneficios presentan para las terapias medicamentosas.

3.1.2. *Cuantificación de Bacterias heterótrofas aerobias mesófilas.*

El número de bacterias heterótrofas aeróbicas mesófilas viables en el balneario “La Virgen” alcanzan un valor promedio de 12 UFC/mL, dicho valor es semejante a los obtenidos en los estudios realizados por DE LA ROSA, María et al.

En el año 2001 sobre la Microbiología de las aguas mineromedicinales del balneario El Paraíso de Manzanera en Teruel-España, en el 2004 en los balnearios de Jaraba en Zaragoza-España, en el 2007 en el balneario Puente Viesgo en Cantabria-España donde obtuvieron valores menores a 10 UFC/mL de bacterias heterótrofas y oligotrófas viables, y en el 2011 en los manantiales mineromedicinales del balneario de Baños de la Concepción en Albacete-España donde hubo menos de 20 UFC/mL.

Lo expuesto nos indica que esta concentración está dentro del rango permisible por la norma española, la que nos indica que el limite permisible es menor a 100 UFC/mL para aguas recreacionales.

La concentración de bacterias heterótrofas aerobias mesófilas viables en el Balneario La Virgen en Baños-Ecuador es 10 veces menor a los valores obtenidos; por MOSSO, María et al. en el 2002 en el análisis de la microbiología del agua mineromedicinal de los Balnearios de Alhama en Granada-España y en el 2006 en el Balneario Cervantes en Ciudad Real- España; y por DE LA ROSA, María

et al. en el 2012, en el análisis microbiológico de las aguas del balneario El Raposo en Badajoz-España donde obtuvieron un número menor a 100 UFC/mL de bacterias heterótrofas y oligotróficas, es decir que el Balneario La Virgen tiene un adecuado mecanismo de protección, es decir una limpieza y desinfección apropiado contra este tipo de microorganismos.

3.1.3. *Cuantificación de Coliformes Totales y fecales.*

En el balneario de La Virgen se obtuvo valores de coliformes fecales de 17 UFC/mL y de coliformes totales de 109 UFC/mL, los valores altos de coliformes no necesariamente representa que existe una contaminación, debido a que este tipo de microorganismos están presentes en el suelo y desde ahí pueden pasar a las aguas dulces, por otro lado la apreciable concentración de coliformes fecales si representa contaminación, la que podría provenir de las baterías sanitarias que no tienen buena limpieza/desinfección o a que las cañerías presenten fugas.

En estudios realizados por DE LA ROSA, María et al. en el año 2001 sobre la Microbiología de las aguas mineromedicinales del balneario El Paraíso de Manzanera en Teruel-España, en el 2007 en el balneario Puente Viesgo en Cantabria-España y en el 2011 en los manantiales mineromedicinales del balneario de Baños de la Concepción en Albacete-España existieron ausencia de coliformes totales y fecales.

Mientras que en los análisis realizados por el mismo autor en el 2004 en los balnearios de Jaraba en Zaragoza-España y en el 2012 en el balneario El Raposo en Badajoz-España existió ausencia de coliformes fecales y una concentración de coliformes totales del 2.5 % de la microbiota total. Estos valores obtenidos por DE LA ROSA, María., et al., se encuentran dentro de la los límites permisibles para aguas de consumo humano del Real Decreto del 2003.

Estos valores expuestos están muy por debajo de los que se obtuvieron en nuestro estudio, es decir que el agua de la piscina presentan apreciable grado de material fecal disuelto.

En el 2006 MOSSO, María et al. realizaron el análisis de la microbiología de los manantiales del Balneario Cervantes en Ciudad Real- España obteniendo una concentración de 4% en coliformes totales y ausencia de coliformes fecales. Estas aguas están dentro de los límites permisibles por el Real Decreto del 2002 para aguas envasadas, debido a que la presencia en bajas cantidades de coliformes totales no representa contaminación, porque este tipo de microorganismos están en el suelo.

Estos valores están muy por debajo de los obtenidos en nuestro estudio, en donde debido a su alta concentración de coliformes totales y fecales representan potencial riesgo para la salud de las personas que le den uso recreativo.

3.1.4. *Cuantificación de Pseudomonas y Staphylococcus aureus.*

Los resultados que se obtuvieron en el estudio microbiológico del balneario de La Virgen Baños-Ecuador fueron; concentración de *Pseudomonas* 92 UFC/mL y de *Staphylococcus aureus* 13 UFC/mL, lo que indica que existe una contaminación con aguas residuales así como también humana, tanto *Pseudomonas* como *S. aureus* son resistentes a mucho estrés ambiental y son capaces de sobrevivir por largos períodos de tiempo, aun en el agua clorada.

Es muy probable que al entrar en contacto con estas aguas, se produzca en los bañistas infecciones urinarias, de heridas, oculares entre otras.

En el 2006 MOSSO, María et al. realizaron el análisis microbiológico de los manantiales del Balneario Cervantes en Ciudad Real- España, en los estudios realizados por DE LA ROSA, María et al. en el año 2001 sobre la Microbiología de las aguas mineromedicinales del balneario El Paraíso de Manzanera en Teruel-España y en el 2011 en el balneario de Baños de la Concepción en Albacete-España existieron ausencia de *Pseudomonas* y *Staphylococcus aureus*.

Estos balnearios no presentan ningún tipo de contaminación, por lo que según el Real Decreto (2003) estas aguas son aptas para el consumo humano, muy por el contrario sucede con las aguas termales de nuestro análisis, en la que la concentración de *S. aureus* y *P. luteola* es elevada, lo que indica que estas aguas tienen apreciable contaminación con aguas residuales y al entrar en contacto con ellas, pacientes, especialmente con enfermedades crónicas, pueden empeorar sus patologías.

En otros análisis llevados a cabo por DE LA ROSA, María et al. en el año 2004 en los balnearios de Jaraba en Zaragoza-España, en el año 2007 en el balneario Puente Viesgo en Cantabria-España y en el 2012 en el balneario El Raposo en Badajoz-España existe ausencia de *Staphylococcus aureus* y una concentración de *Pseudomonas* del 4.5% de la microbiota total, debido a su bajo contenido no representa peligro alguno a la salud de los bañistas.

Las *Pseudomonas* son bacterias ubicuas que se pueden encontrar en aguas superficiales debido a una contaminación con aguas residuales.

En nuestro estudio hubo número elevado de colonias de estos dos microorganismos, lo que indica que el tratamiento de limpieza y desinfección es inadecuado debido a que el número de bañistas es elevado y son ellos los que pueden producir contaminación cruzada, desde los pisos hacia la piscina, al entrar en contacto con estas aguas se puede adquirir patologías como infecciones y meningitis.

3.1.5. *Cuantificación de mohos y levaduras.*

El número de colonias presentes en los estudios en el balneario de La Virgen Baños-Ecuador son 68 UFC/mL de Hongos, correspondiente al 29 % de la microbiota total, de las cuales 57 UFC/mL corresponden a Levaduras, este número elevado se debería a que estos microorganismos son muy ubicuos que están presentes mayoritariamente en el suelo y a la presencia de gran cantidad de materia orgánica en el agua lo que facilita su proliferación.

Consideramos importante una mayor limpieza y desinfección de toda la infraestructura del Balneario ya que podrían afectar la salud de los bañistas, ya sea produciendo alergias como también micosis.

En el 2006 MOSSO, María et al. realizaron el análisis de la microbiología de los manantiales del Balneario Cervantes en Ciudad Real- España obteniendo un numero de colonias de Hongos de 17 UFC/mL.

Por otro lado en los estudios realizados por DE LA ROSA, María et al; en el año 2001 sobre la Microbiología de las aguas mineromedicinales del balneario El Paraíso de Manzanera en Teruel-España, en el año 2004 en los balnearios de Jaraba en Zaragoza-España y en el 2011 en el balneario de Baños de la Concepción en Albacete-España existieron valores mínimos de colonias de Hongos correspondiente a 10 UFC/100mL.

Otros estudios realizados por los mismos autores en el año 2007 en el balneario Puente Viesgo en Cantabria-España los valores disminuyen a 4 UFC/100mL y otros análisis realizados en el año 2012 en el balneario El Raposo en Badajoz-España la cantidad aumenta a 7 UFC/mL.

En todos los estudios realizados por DE LA ROSA, María et al. los valores están dentro de los parámetros permisibles para consumo humano según el Real Decreto (2003) y difieren en 10 veces por debajo en comparación con nuestros resultados, estos microorganismos proliferan rápidamente

en zonas húmedas, es por ello que en los balnearios los encontramos en los vestidores, desde donde son arrastrados por el calzado de los bañistas hacia las piscinas, estos microorganismos en número elevado pueden causar infecciones urinarias especialmente en mujeres en edad fértil (Candidiasis).

3.1.6. *Identificación de colonias proliferadas.*

El número de colonias aisladas en el Balneario La Virgen en Baños- Ecuador fueron 240 e identificamos 172, predominaron los bacilos Gram negativos (45%), los bacilos Gram positivos fueron los que se encuentran minoritariamente (9,6%), mientras que los cocos Gram positivos estuvieron en número intermedio (16.7%).

Esta situación concuerda con el estudio realizado por DE LA ROSA, María & MOSO, María donde manifiestan que en aguas hipertermales predominan las bacterias Gram positivas mientras que en las Mesotermales predominan los bacilos Gram negativos y los cocos Gram positivos, esto se debería a que las bacterias Gram negativas resisten mejor el calor.

En cuanto a la propiedad fermentativa en O/F, en el Balneario La Virgen se encontraron bacterias oxido-fermentativas, es decir anaerobias facultativas, resultados que concuerdan con el estudio de la diversidad microbiana de las aguas minerales y termales realizado por DE LA ROSA, María & MOSO, María, donde se afirma que la mayoría de microorganismos son aerobios o anaerobios facultativos, ya que sus características fisicoquímicas son adecuadas para su proliferación.

En los estudios realizados por DE LA ROSA, María et al, en el año 2001 sobre la Microbiología de las aguas frías mineromedicinales del balneario El Paraíso de Manzanera en Teruel-España, se han identificado 34 colonias, que corresponden a; 3% bacilos Gram negativos, el 64,7% bacilos Gram positivos y 32.3% son cocos Gram positivos. Los bacilos Gram negativos que predominan son del género *Alcaligenes*, los bacilos Gram positivos que se han aislado son del género *Bacillus* y los cocos Gram positivos mayoritariamente identificados son del género *Staphylococcus*.

Estos estudios difieren con el nuestro en cuanto al número de colonias así como también a las que predominan los bacilos Gram negativos cuyo género predominante es *Chryseomona*, los géneros de bacilos y cocos Gram positivos son similares, esto se debería a la diferente temperatura de las aguas y representa alto riesgo para la salud de los bañistas debido a que existen bacterias altamente patógenas.

En el año 2004 los mismos autores analizaron los balnearios Mesotermales de Jaraba en Zaragoza-España se aisló 254 cepas, 244 UFC/mL se identificaron, el 65% fueron bacilos Gram negativos, 13.8% fueron bacilos Gram positivos y 17.3% cocos Gram positivos. Los bacilos Gram negativos no fermentadoras que predominaron fueron *Burkholderia cepacia* y *Ochrobactrum anthropi*, los bacilos Gram negativos fueron *Enterobacter cloacae* y los cocos Gram positivos correspondieron al género *Staphylococcus*.

Este balneario no presenta en su composición bacterias patógenas por lo que no presenta ningún riesgo para la salud de las personas que usan para sus terapias, situación que no sucede igual con la composición de las aguas de nuestro balneario.

Otros estudios realizados por DE LA ROSA, María et al, en el año 2007 en el balneario Mesotermal Puente Viesgo en Cantabria-España aislaron 37 cepas, de estas, 62.2% fueron bacilos Gram negativos, 18.9% bacilos y cocos Gram positivos. Los bacilos Gram negativos no fermentadoras que predominaron fueron *Pseudomonas alcaligenes* y *stutzeri*, los bacilos Gram positivos fueron *Bacillus* y *Rhodococcus* y los cocos Gram positivos fueron del género *Micrococcus* y *Staphylococcus*.

Estos resultados difieren totalmente con los obtenidos en las termas “La Virgen”, tanto en número de colonias identificadas como en el tipo de géneros aislados, esto se debería a la diferencia en las condiciones ambientales, situación geográfica y origen geotermal.

DE LA ROSA, María et al, en el 2011 analizaron en el balneario Mesotermal de Baños de la Concepción en Albacete-España identificaron 135 UFC/mL, de las cuales, 60% fueron bacilos Gram negativos, 29.6% bacilos Gram positivos y 10.4% cocos Gram positivos. Los bacilos Gram negativos que predominan fueron *Gammaproteobacteria*, los bacilos Gram positivos fueron *Anthobacter* y *Corynebacterium*, y los cocos Gram positivos identificados son *Staphylococcus*.

En el año 2012 en el balneario Mesotermal El Raposo en Badajoz-España identificaron 115 UFC/mL que corresponden a; 73% bacilos Gram negativos, 23,5% bacilos Gram positivos y 3.5% fueron cocos Gram positivos. Los bacilos Gram negativos no fermentadores predominantes fueron de la especie *Pseudomonas fluorescens*, los bacilos Gram positivos fueron *Bacillus* y los cocos Gram positivos identificados fueron del genero *Staphylococcus*.

La microbiota de cada balneario es absolutamente diferente, dependen de sus características fisicoquímicas, de la situación geográfica y de la cultura de los bañistas. En nuestro balneario hay alta concentración de bacterias patógenas debido a que la ciudad de Baños de Agua Santa es altamente turística y uno de sus atractivos es el agua termo medicinal.

3.1.7. *Caracterización de especies identificadas.*

La especie predominante en el presente trabajo fue *Chryseomona luteola*, mientras que *Bacillus coagulans*, *Brevibacterium epidermidis* y *linens*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *saccharolyticus*, no difieren mayoritariamente en su concentración, detalladamente se muestra en la Grafica 9-3.

Bacillus coagulans son saprofitas, habitan en el suelo y el agua, son termófilas, en nuestro estudio crecieron 8 UFC/mL en muestras provenientes del ojo de agua, su crecimiento fue escaso debido a que a altas temperaturas estas se encuentran en estado latente, la presencia de estas proporciona un valor nutraceútico a estas fuentes, debido a que es una bacteria probiótica, la que produce bacteriocinas que inhiben el crecimiento de otras bacterias similares (*H. pylori*).

Brevibacterium linens y *epidermidis*; obtuvimos 15 UFC/mL para *B. linens* y 10 UFC/mL para *B. epidermidis*, estas bacterias nos indicaron contaminación humana, tanto directamente como cruzada, ya que estas bacterias habitan tanto en el suelo como en la piel de los humanos. Estas bacterias no representan riesgo potencial para la salud humana, *B. linens* es útil en la fermentación (costra) de quesos Munster y Limburger, mientras que *B. epidermidis* contiene tioésteres S-metilo que dan olor a la piel.

Escherichia coli; la concentración de este microorganismo fue 17 UFC/mL, que representa el 7% de la microbiota de las termas “La Virgen”, la presencia de ella nos indica que existe contaminación fecal ya que habita en el intestino de mamíferos, es una bacteria patógena que causa infecciones del aparato excretor, vías urinarias, cistitis, uretritis, meningitis, peritonitis, neumonía, entre otras. Debido a su concentración representa riesgo para la Salud, en especial en pacientes con enfermedades crónicas.

Staphylococcus aureus y *saccharolyticus*; la presencia de estos microorganismos en el agua fue 30 UFC/mL, las 17 UFC/mL correspondieron a la especie *S. saccharolyticus*, estos habitan en las mucosas y piel de los humanos, lo que evidencia una contaminación humana directa.

Este tipo de bacterias son altamente patógenas, *S. aureus* causa infecciones nosocomiales, mientras que *S. saccharolyticus* pueden causar endocarditis infecciosa, es decir que al entrar en contacto tópico con estas aguas se pueden adquirir graves infecciones.

Chryseomona luteola: el hábitat normal de estas bacterias es el agua, el suelo y ambientes húmedos, la concentración de estas en las aguas del balneario “La Virgen” fue 92 UFC/mL, lo que nos mostró que el proceso de desinfección y tratamiento de aguas no es el adecuado, representando así un peligro para la salud de los bañistas ya que puede causar bacteremia, meningitis, endocarditis, peritonitis entre otras patologías especialmente en pacientes que hayan tenido intervenciones quirúrgicas.

3.2. Pruebas de hipótesis.

Debido a su alto contenido de iones sulfato, dureza, pH neutro y por su alta temperatura, la microbiota autóctona de las termas “La Virgen” corresponde solo al género *Bacillus*. En la piscina del balneario existe contaminación debido a la situación geográfica, a la cultura de los turistas y a la falta de limpieza y desinfección minuciosas en cada parte de la infraestructura del balneario, dicha contaminación se da con bacterias patógenas responsables de enfermedades infectocontagiosas.

3.3. Presentación de resultados.

3.3.1. Pruebas in situ del balneario de las termas “La Virgen”

Cuadro 21-3. Pruebas in Situ de las termas “La Virgen”.

Parámetro	Lugar	
	Ojo de Agua	Piscina
pH	7.40	7.10
Conductividad	3999 uS/cm	3808 uS/cm
Sólidos Totales	2000 ppm	1897 ppm
Temperatura	51.3 °C	36.6 °C
Color	Amarillenta	Amarillenta
Turbidez	Leve	Moderada

Fuente: SORIA, Arturo. 2015

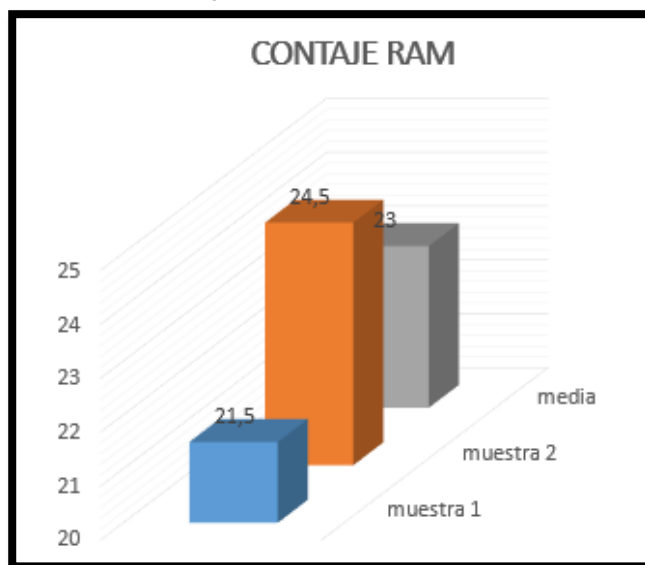
3.3.2. Recuento de Aerobios Mesófilos (RAM).

Cuadro 22-3. RAM de las termas de “La Virgen”

LUGAR	Toma 1 (UFC/mL)	Toma 2 (UFC/mL)	Media (X)	Varianza (S2)	D. Estándar (S)
Ojo de Agua	18,00	14,00	16,00	8,00	2,83
Piscina	25,00	35,00	30,00	50,00	7,07
X TOTAL	21,50	24,50	23,00	4,50	2,12

Fuente: SORIA, Arturo. 2015

Gráfica 1 – 3. RAM de las termas de “La Virgen”



Fuente: SORIA A. 2015

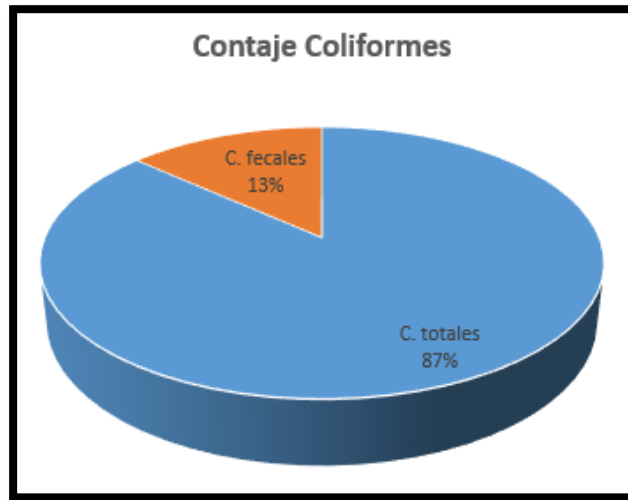
3.3.3. Recuento de Coliformes Totales y Fecales*.

Cuadro 23-3. Recuento de coliformes totales y coliformes fecales (*) de las termas de “La Virgen”

LUGAR	Toma 1 (UFC/mL)	Toma 2 (UFC/mL)	Media	Varianza (S2)	D. Estándar (S)
Ojo de Agua	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	0,00*	0,00	0,00	0,00	0,00
Piscina	216,00	220,00	218,00	8,00	2,83
	32,00*	36,00	34,00	8,00	2,83
X	108,00	110,00	109,00	2,00	1,41
TOTAL	16,00*	18,00	17,00	2,00	1,41

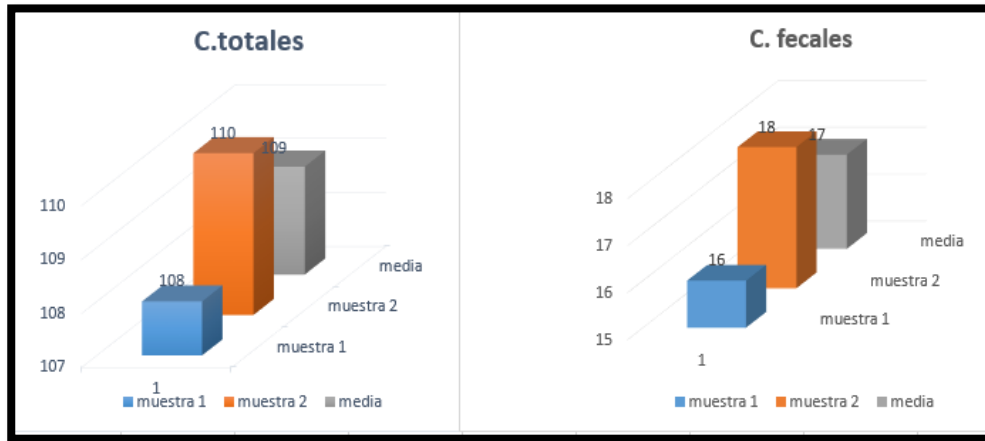
Fuente: SORIA, Arturo. 2015

Gráfica 2 - 3. Recuento de Coliformes las termas de “La Virgen”



Fuente: SORIA, Arturo. 2015.

Gráfica 3 – 3. Recuento de Coliformes totales y fecales de las termas de “La Virgen”



Fuente: SORIA, Arturo. 2015

3.3.4. Recuento de Staphylococcus.

Cuadro 24-3. Contaje de Staphylococcus en las termas de “La Virgen”

LUGAR	Toma 1 (UFC/mL)	Toma 2 (UFC/mL)	Media	Varianza (S2)	D. Estándar (S)
Ojo de Agua	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Piscina	79,00	81,00	80,00	2,00	1,41
X TOTAL	39,5	40,5	40,00	0,50	0,71

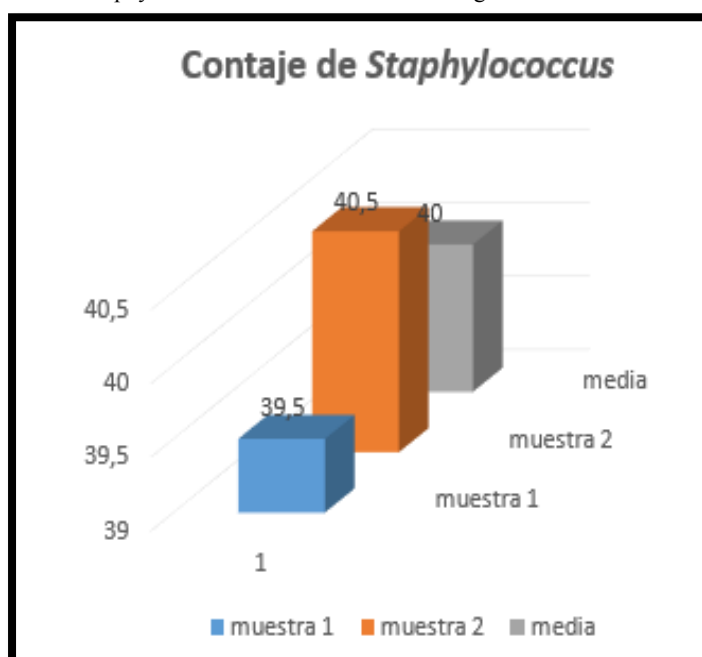
Fuente: SORIA, Arturo. 2015

Cuadro 25-3. Cuantificación e interpretación de colonias en Staph Express.

Color de Colonia en Petrifilm	# UFC/mL muestreo 1	# UFC/mL muestreo 1	Interpretación según Petrifilm
Negro	12	8	Pueden o no ser <i>S. aureus</i>
Azul- verde	14	20	No son <i>S. aureus</i>
Roja-Violeta	14	12	Son <i>S. aureus</i>

Fuente: SORIA, Arturo. 2015

Gráfica 4-3. Recuento de Staphylococcus de las termas de “La Virgen”



Fuente: SORIA A. 2015.

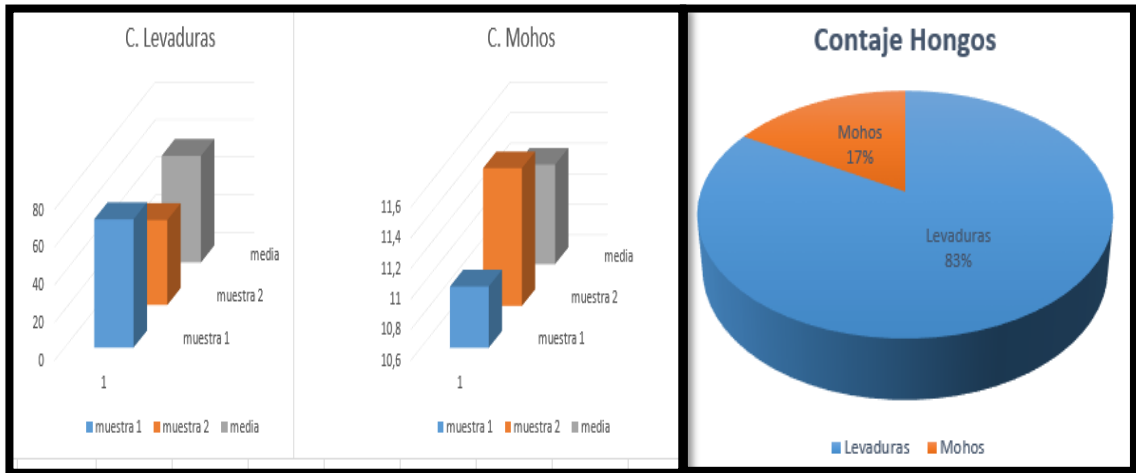
3.3.5. Recuento de Mohos y Levaduras.

Cuadro 26-3. Contaje de Levaduras y Mohos* en las termas de “La Virgen”

LUGAR	Toma 1 (UFC/mL)	Toma 2 (UFC/mL)	Media	Varianza (S2)	D. Estándar (S)
Ojo de Agua	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	0,00*	0,00	0,00	0,00	0,00
Piscina	136,00	90,00	113,00	1058,00	32,53
	22,00*	23,00	22,50	0,50	0,71
X	68,00	45,00	56,50	264,50	16,26
TOTAL	11,00*	11,50	11,25	0,13	0,35

Fuente: SORIA, Arturo. 2015

Gráfica 5-3. Cuantificación de Hongos de las termas de “La Virgen”



Fuente: SORIA, Arturo. 2015

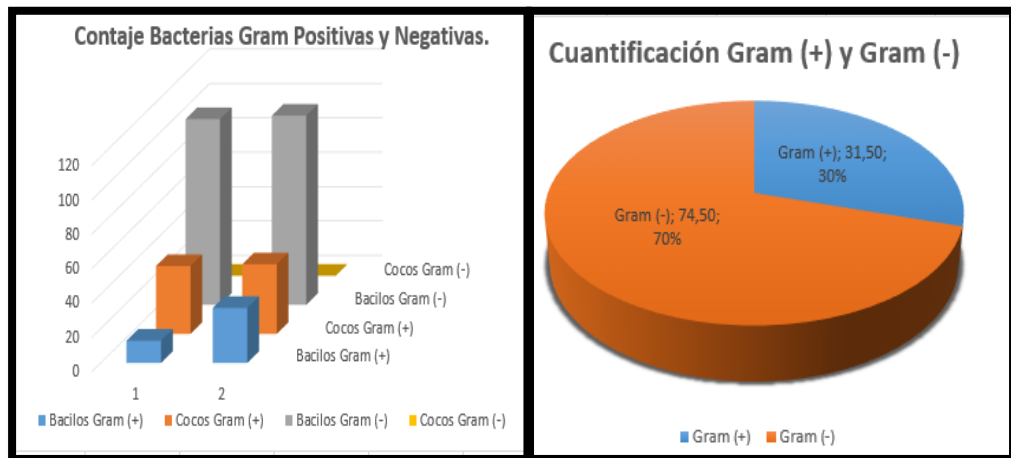
3.3.6. *Número de Bacterias Gram Positivas y Gram Negativas Aisladas.*

Cuadro 27-3. Contaje de Bacterias Gram Positivas Y Gram Negativas en las termas de “La Virgen”

Bacteria		Toma 1 (UFC/mL)	Toma 2 (UFC/mL)	Media	Varianza (S ²)	D. Estándar (S)
Gram (+)	Bacilos	14,00	32,00	23,00	162,00	12,73
	Cocos	39,50	40,50	40,00	0,50	0,71
Gram (-)	Bacilos	108,00	110,00	109,00	2,00	1,41
	Cocos	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Fuente: SORIA, Arturo. 2015

Gráfica 6-3. Cuantificación de Bacterias Gram Positivas y Gram Negativas en las termas de “La Virgen”



Fuente: SORIA, Arturo. 2015

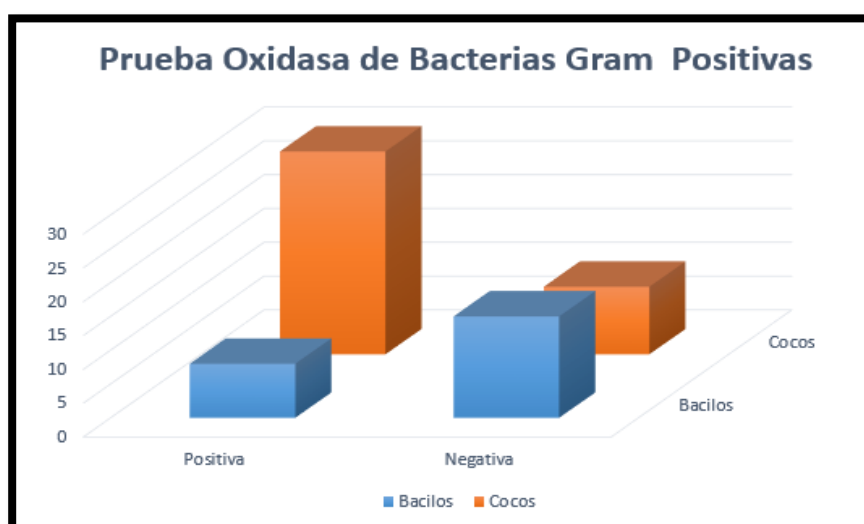
3.3.7. Bacterias Gram Positivas y sus Características Microbiológicas.

Cuadro 28-3. Características microbiológicas de las B. Gram Positivas las termas de “La Virgen”

Bacteria	UFC/mL	Petrifilm	Color	Catalasa	Oxidasa	Almidón	Gelatina
Bacilos	8	AC (13)	Rosado	Positiva	Positiva	Positiva	Negativa
	15	AC (2)	Rojo	Positiva	Negativa	Positiva	Positiva
Cocos	10	STX (2)	Negro	Positiva	Positiva		
	13	STX (4 y 24)	Rojas	Positiva	Negativa		
	17	STX (6 y 30)	Azul	Positiva	Negativa		

Fuente: SORIA, Arturo. 2015

Gráfica 7-3. Cuantificación en base a la Prueba Oxidasa de Bacterias Gram Positivas de las termas “La Virgen”.



Fuente: SORIA, Arturo. 2015

3.3.8. Bacterias Gram Negativas y sus características microbiológicas.

Cuadro 29-3. Características microbiológicas de las B. Gram Negativas de las termas de “La Virgen”

Bacteria	UFC/mL	Petrifilm	Color	Catalasa	Oxidasa	Fermentación	Movilidad
Bacilos	83	EC (7)	Roja	Positiva	Negativa	Positiva	Positiva
	9	EC (22)	Roja	Positiva	Negativa	Positiva	Negativa
	17	EC (14)	Azul (gas)	Positiva	Negativa	Positiva	Positiva

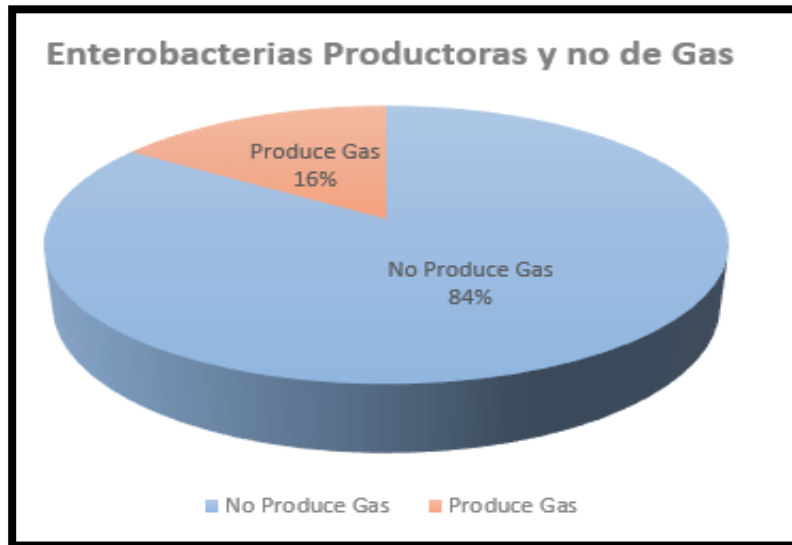
Fuente: SORIA, Arturo. 2015

Cuadro 30-3. Características oxido/fermentativas de las B. Gram Negativas

Bacteria	UFC/mL	Petrifilm	Fermentación		Interpretación	
			O	F	Oxida/fermenta/inerte	Aerobiasis
Bacilos	83	EC	Amarillo	Amarillo	Oxida y fermenta	A. facultativa
	9	EC	Amarillo	Amarillo	Oxida y fermenta	A. facultativa
	17	EC	Amarillo	Amarillo	Oxida y fermenta	A. facultativa

Fuente: SORIA, Arturo. 2015

Gráfica 8-3. Cuantificación de la producción de Gas de Bacterias Gram Negativas



Fuente: SORIA, Arturo. 2015

3.3.9. *Bacterias Identificadas y sus características microbiológicas.*

Cuadro 31-3. Clasificación según especie de los Bacilos identificados en las termas de “La Virgen” según MAC FADDIN (2004)

MUESTRA 1: OJO DE AGUA								
# de UFC/mL	Petrifilm	Color	Gram	Prueba Catalasa	Prueba Oxidasa	Almidón	Gelatina	Nombre de Bacteria
8	AC (13)	Rosado	Bacilo Gram Positivo	Positiva	Positiva	Positiva	Negativa	<i>Bacillus coagulans</i>
MUESTRA 2: PISCINA DEL BALNEARIO								
15	AC (2)	Rojo	Bacilo Gram Positivo	Positiva	Negativa	Positiva	Positiva	<i>Brevibacterium linens</i>
# de UFC/mL	Petrifilm	Color	Gram	P. Catalasa	P. Oxidasa	O/F	Movilidad	Nombre de Bacteria
83	EC (7)	Roja sin Gas	Bacilos Gram Negativos	Positiva	Negativa	Positiva/Positiva	Positiva	<i>Chryseomona luteola</i>
9	EC (22)						Negativa	
17	EC (14)	Azul con Gas					Positiva	<i>E. coli</i>

Fuente: MAC FADDIN. (2004)

Realizado por: SORIA, Arturo. 2015

Cuadro 32-3. Pruebas Bioquímicas Confirmatorias para Enterobacterias.

Petrifilm	Kliger	Citrato	Indol/SIM	Ureasa
EC 7	Acido/Acido	-	+	-
EC 22	Alcalino/Acido	-	-	-

Fuente: MAC FADDIN. (2004).

Realizado por: SORIA, Arturo. 2015

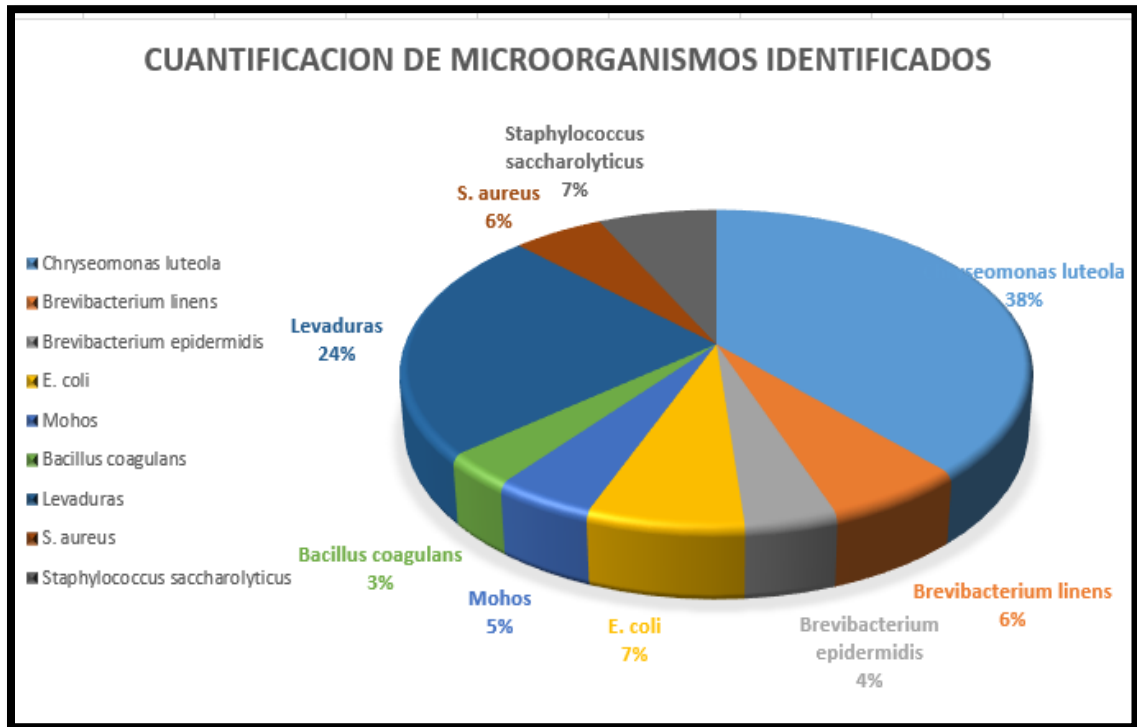
Cuadro 33-3. Características de los Cocos Identificados en las termas de “La Virgen”

MUESTRA 2: PISCINA DEL BALNEARIO							
UFC/mL	Petrifilm	Color	Gram	Catalasa	Oxidasa	Manitol	Nombre de Bacteria
10	STX (2)	Negro	Cocos Gram Positivos	Positiva	Positiva	Crecimiento	<i>Brevibacterium epidermidis</i>
13	STX (4 y 24)	Rojas Violetas			Negativa	Crecimiento y Fermentación	<i>Staphylococcus aureus</i>
17	STX (6 y 30)	Verdes Azuladas			Negativa	No crece	<i>Staphylococcus saccharolyticus</i>

Fuente: MAC FADDIN. (2004)

Realizado por: SORIA, Arturo. 2015

Gráfica 9-3. Cuantificación de acuerdo a especies identificadas en las termas de “La Virgen”



Fuente: SORIA, Arturo. 2015

CONCLUSIONES

- Se consiguió muestrear aguas del balneario “La Virgen” tanto del ojo como de la piscina, garantizando la máxima asepsia para garantizar que el análisis microbiológico nos refleje la microbiota presente en este balneario en estudio.
- Se estableció que estas fuentes hídricas son hipertermales, duras, ligeramente básicas y ricas en minerales. En la piscina la concentración de iones y dureza disminuyen directamente proporcional con el pH. La temperatura y turbidez disminuyen gradualmente en un 40 % en esta última.
- Se determinó que la población bacteriana heterótrofa aeróbica mesófila total es 23 UFC/mL, correspondiente al 9% de la microbiota del balneario, de las cuales 8 UFC/mL corresponden a la microbiota autóctona de las vertientes termales y estas corresponden a la especie *Bacillus coagulans* y las 15 UFC/mL restante pertenecen a la especie *Brevibacterium linens*.
- Se cuantificó y determinó que las vertientes termales garantizan la calidad sanitaria, pero no sucede lo mismo con el agua de la piscina del balneario ya que la presencia de *Pseudomonas* es 92 UFC/mL y corresponde a la especie *Chryseomonas luteola*, 109 UFC/mL de Coliformes Totales, de las cuales el 14% corresponde a Coliformes Fecales y 13 UFC/mL de *Staphylococcus aureus*. Es decir que el 51% de la microbiota total corresponde a estos géneros patógenos que hacen que el agua de la piscina no garantice la inocuidad a los bañistas.
- Se estipuló y conoció que la presencia de hongos solamente se da en la piscina y representan el 29% de la microbiota total. Las levaduras están mayoritariamente presentes en relación a los mohos, la concentración de levaduras abarcan el 80% de la concentración de hongos que proliferan en la piscina del balneario.
- Se aisló e identificó, bacterias Gram Negativas patógenas del genero *Chryseomonas* de la especie *luteola* y del genero *Escherichia* de la especie *coli*, organismos Gram Positivos patógenos del genero *Staphylococcus* de las especies *aureus* y *saccharolyticus*, y microorganismos benéficos del genero *Bacillus* especie *coagulans* y del género *Brevibacterium* de las especies *lines* y *epidermidis*.
- Se socializó este trabajo investigativo con el Departamento Financiero y Administrativo del GAD del Cantón Baños de Agua Santa de la Provincia de Tungurahua logrando así que esta

entidad que es la encargada de los balnearios busque el tratamiento más idóneo aplicable para mejorar la calidad sanitaria de los mismos.

RECOMENDACIONES

- Es necesario ampliar este estudio realizando control del ambiente In Situ, muestreando en la piscina al estar recién llenada, cuando esté con la capacidad máxima de bañistas inmersos en ella y también muestreando en diferentes épocas del año, debido a que hay temporadas donde predomina el turismo nacional y otras donde es mayoritario el turismo internacional.
- Resulta conveniente realizar un estudio de los parámetros fisicoquímicos In Situ cuando la actividad eruptiva del volcán Tungurahua se encuentre elevada, para controlar la concentración de CO₂ y demás gases que podrían desprenderse debido al origen magnético de estas termas.
- En base a las toxinas que pueden producir los diferentes microorganismos encontrados, en diferentes épocas del año y con pruebas de control de ambiente, evaluar el grado de daño que puede ocasionar en pacientes con enfermedades crónicas que puede presentar un individuo.
- Implementar normativas para el uso adecuado de la infraestructura del balneario y asegurar su cumplimiento para disminuir prioritariamente la contaminación fecal mejorando de esta forma la calidad e inocuidad de estas termas recreacionales que mayoritariamente tienen usos hidroterapéuticos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

1. **ALFARO, Claudia.** Geoquímica del Sistema Geotérmico de Paipa. Bogotá-Colombia. Ingeominas. 2002. Pp. 2-5.
http://www.researchgate.net/profile/Francisco_Velandia/publication/249315485_Caracterizacin_geolgica_del_cuerpo_volcnico_de_Iza_Boyaca-Colombia/links/00b7d52b379de84636000000.pdf
2014-08-21.
2. **ALVAREZ, Elizabeth., et al.** Evolución química y relaciones empíricas en aguas naturales. Sistema automatizado para el monitoreo de las aguas. La Habana-Cuba. Voluntad Hidráulica. 1990. Pp. 15-25.
sdes.imta.mx/tyca/revistadigital198237645imta.../rev.../publication.pdf
2014-08-27.
3. **ARMIJO, Manuel & SAN MARTIN, Josefina.** Clasificación de las aguas mineromedicinales. Curas y Balnearias y Climáticas. Talasoterapia y Helioterapia. Madrid-España. Computense. 2010a. Pp. 219-223.
<http://www.hidromed.org/hm/images/pdf/CentenarioSEHM.pdf>
2014-08-21.
4. **ARMIJO, Manuel & SAN MARTIN, Josefina.** Aguas minerales. Conceptos generales. Curas y Balnearias y Climáticas. Talasoterapia y Helioterapia. Madrid-España. Computense. 2010b. Pp. 11-16.
www.researchgate.net/...One.../02e7e517aab2b1a0d8000000.pdf
2014-08-21.
5. **ATLAS, Ronald & BARTHA, Richard.** Ecología microbiana y Microbiología ambiental. Madrid-España. Addison Wesley. 1998. Pp. 290-294.
<http://www.ciraunan.edu.ni/media/documentos/Ref.%20%20Bibliogr%C3%A1fica%20en%20General.pdf>
2014-09-08

6. **BALL, Philip.** Una biografía del Agua. Madrid-España. Turner. 1999. Pp. 72-73.
<http://www.redalyc.org/pdf/644/64419046013.pdf>
2014-08-13
7. **BALDOCK, John.** Geology of Ecuador. Bulletin of the National Geological Map of the Republic of Ecuador. Ministerio de Recursos Naturales y Energía. Quito-Ecuador. Dirección General de Geología y Minas. 1982. p.70.
http://www.horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/.../010022380.pdf
2014-09-08
8. **BARROW, Geoffrey & FELTHAM, Rhomb.** Cowan and Steel's Manual for Identification of Medical Bacteria. 3ra Ed. Cambridge University Press. Cambridge-Inglaterra. 1993. p. 331.
http://www.academia.edu/8106702/Cowan_and_Steels_manual_for_the_identification_of_medical_bacteria_Manual_for_the_identification_of_medical_bacteria_THIRD_EDITION
2014-08-21.
9. **BERGEY, David.** Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Madrid-España. Int. J. of Syst. Bact. 1985. p. 408
<https://books.google.com/books?isbn=038721609X>
2014-08-21
10. **BURGGRAF, Siemen., et al.** Reclassification of the Crenarchaeal orders and families in accordance with 16S rRNA sequence data. California D.F.-United States of America. Int. J. Syst. Evol. Bacteriol. 1997. Pp. 657-660.
<http://www.ij.sgmjournals.org/content/47/3/657.full.pdf+html>
2014-08-27.
11. **CANN, Irene., et al.** Characterization of two novel saccharolytic anaerobic thermophiles, *Thermoanaerobacterium polysaccharolyticum* sp. nov., *Thermoanaerobacterium zae* sp. nov., emendation of the genus *thermoanaerobacterium*. Madrid-España. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2001. Pp. 293-302.
<https://books.google.com/books?isbn=0387684891>
2014-09-08

12. **CHAPMAN, Gary.** The significance of sodium chloride in studies of staphylococci. Barcelona-España. J. Bacteriol. 1945. Pp. 201-203.
[https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8771.](https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8771)
2014-09-15
13. **CONSTANTINOS, Edwuard & ANTRANIKIAN, Garo.** Extremophiles, pH, temperature, and salinity. Washington. D. C.-United States of America. Microbial diversity and bioprospecting. 2004. pp. 146-152.
<http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis249.pdf>
2014-08-27.
14. **CHUNG, Aracely., et al.** *Thermus igniterrae* sp. nov. and *Thermus antranikianii* sp. nov., two new species from Iceland. Reikiavik-Islandia. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2000. Pp. 209-217.
[http://www1.ci.uc.pt/imar/unit/people/cvs/cv/a_p_chung.php.](http://www1.ci.uc.pt/imar/unit/people/cvs/cv/a_p_chung.php)
2014-08-21.
15. **DEMIRJIAN, David., et al.** Enzymes from Extremophiles. Cambridge-Inglaterra. Current Opinion in Chemical Biology. 2001. Pp. 144-151.
<https://books.google.com/books?isbn=940179118X>
2014-09-08
16. **EDWARDS, Clive., et al.** Microbiology of extreme environments. Buckingham-Inglaterra. Clive Edwards. 1990. p. 251.
[www.cell.com/cell/abstract/0092-8674\(90\)90005-Y](http://www.cell.com/cell/abstract/0092-8674(90)90005-Y)
2014-08-27
17. **ECUADOR. INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGÍA E HIDROLOGÍA. INAMHI.** Inventario de las aguas termominerales del Ecuador. Termalismo. Quito-Ecuador. 2012. p.89.
[http://issuu.com/inamhi/docs/termalismo.](http://issuu.com/inamhi/docs/termalismo)
2014-09-08

18. **ESPAÑA. INSTITUTO CARTOGRÁFICO Y GEOLÓGICO DE CATALUÑA.** Gradiente y flujo de calor. Cataluña-España. Geotermia del subsuelo. 2014. Pp. 35-39.
<http://www.icgc.cat>
2014-09-15.
19. **ESTADOS UNIDOS DE AMERICA. OFICIAL METHODS OF CHEMISTRY ANALYSIS.** AOAC 19 Ed. New York–United States of America. 2012. Pp. 15-23.
http://www.aoac.org/imis15_prod/AOAC/Publications/Official_Methods_of_Analysis/AOAC_Member/Pubs/OMA/AOAC_Official_Methods_of_Analysis.aspx?hkey=5142c478ab50-4856-8939-a7a491756f48.
2014-09-15
20. **ESTADOS UNIDOS DE AMERICA. STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER.** APHA 22.Ed. California-United States of America. 2012. Pp. 23-31.
www.mwa.co.th/download/file_upload/SMWW_1000-3000.pdf
2014-08-13.
21. **FAGUNDO, Juan.** Caracterización de acuíferos por relaciones entre contenidos iónicos y parámetros fisicoquímicos. Madrid-España. CENIC C. Químicas. 1985. Pp. 236-321.
<https://www.yumpu.com/es/document/view/13080723/conferencia-3pdf-contribuciones-a-la-hidrogeoquimica/13>.
2014-08-27.
22. **FAGUNDO, Juan.** Evolución química y relaciones empíricas en aguas naturales. Efecto de los factores geológicos, hidrogeológicos y ambientales. Madrid-España. Hidrogeología. 1990. Pp. 33-46.
http://www.redciencia.cu/geobiblio/paper/1990_Fagundo_Hidrogeologia.pdf
2014-08-21.
23. **FAGUNDO, Juan.** Química del agua Kárstica. Hidroquímica del Karst. Madrid-España. OSUNA, Universidad de Granada. 1996. Pp. 13-212.
http://www.lgt.lt/geoin/files/10_Actividad_karstica.doc.
2014-08-21.

24. **GARRITY, George., et al.** Taxonomic outline of the prokaryotes Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2da ed. New York-Estados Unidos de América. Springer. 2004. Pp. 234-243
www.bergeys.org/outlines/bergeysoutline_5_2004.pdf
2014-08-27.
25. **GASTANY, Gadi.** Aguas Termo Minerales. Madrid-España. Omega. 1984. Pp. 611-614, 632, 636, 637
www.invenmar.org.co/redcostera1/.../7010manualTecnicasanaliticas.pdf
2014-08-13
26. **GRAMOVA, Valery., et al.** Clasificación de las aguas minerales adaptada en Rusia y su estandarización. 32nd Ed. Bad Wrisshofen-Alemania. World Congress of the I. S. M. H. Bad Wrisshofen. 1994. Pp. 99-102.
www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/...bal/clasificacion_aguas_minerales.pdf
2014-08-21.
27. **GREENE, Ashley., et al.** *Deferribacter thermophilus* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic manganese and iron-reducing bacterium isolated from petroleum reservoir. Moscow -Russia. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 1997. Pp. 505-509.
www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9103640
2014-08-27.
28. **HAKI, Godanci & RAKSHIT, Smith.** Developments in industrially important thermostable enzymes a review. Santiago-Chile. Bioresource Technology. 2003. Pp. 17-34.
http://www.academia.edu/9666747/Developments_in_industrially_important_thermostable_enzymes_a_review
2014-08-27.
29. **HERRERA, Juan.** Estudio de factibilidad para la implementación de un complejo turístico hotelero recreacional en la ciudad de Baños. Bitstream. Quito-Ecuador. 1995. p. 46.
<http://repositorio.uide.edu.ec/bitstream/37000/555/1/T-UIDE-0516.pdf>
2014-09-08

30. **HUBER, Robert., et al.** *Archaeoglobus veneficus* sp. nov., a novel facultative chemolithoautotrophic hyperthermophilic sulfite reducer, isolated from abyssal black smokers. New York-United States of America. Syst. Appl. Microbiol. 1997. Pp. 374-380.
<https://www.infona.pl/resource/bwmeta1.element.elsevier-89899089-ca82-31e6-8406-0bc>
2014-08-27.
31. **ITOH, Tatsuo., et al.** *Caldisphaera lagunensis* gen. nov., sp. nov., a novel thermoacidophilic crenarchaeote isolated from a hot spring at Mt Maquiling, Philippines. Manila-Philippines. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2003. Pp. 1149-1154.
http://www.unboundmedicine.com/medline/citation/12892143/Caldisphaera_lagunensis_gen_nov_sp_nov_a_novel_thermoacidophilic_crenarchaeote.
2014-09-08.
32. **KLIGLER, Israel.** A simple medium for the differentiation of members of the typhoid paratyphoid group. Gran Bretaña-Reino Unido. Public Health. 1917. p. 1042.
http://www.britanialab.com/productos/565_hoja_tecnica_es.pdf.
2014-09-08.
33. **LIMON, Arcadio.** Espejo cristalino de las aguas de España. Madrid-España. Francisco García Fernández. Impresor de la Universidad. 1997. p. 331
<http://www.iberlibro.com/ESPEJO-CRISTALINO-AGUAS-ESPA%C3%91A-HERMOSEADO-GUARNECIDO/3737578707/bd>.
2014-08-13
34. **LÓPEZ GETA, Juan. & BAEZA, Caro.** Informe sobre las aguas mineromedicinales, minero-industriales y de bebida envasada existentes en España. Ministerio de Industrias y Energía. Madrid-España. Instituto Geológico y Minero. 1986. Pp. 30-35.
http://info.igme.es/SidPDF%5C034000%5C671%5CMemoria%5C34671_0001.pdf.
2014-09-15
35. **LÓPEZ GETA, Juan., et al.** Guía Operativa para la recogida, almacenamiento y transporte de muestras de aguas subterráneas destinadas al análisis químico y bacteriológico. Cataluña-España. Georence. 1997. Pp. 35-38.
<http://www.dna.gov.ar/CIENCIA/SANTAR07/CD/PDF/GEORE809.PDF>.
2014-09-08.

36. **MAC FADDIN.** Media for isolation-cultivation-identification-maintenance of medical bacteria. Madrid-España. Williams & Wilkins, Baltimore. 1985. p. 1042.
http://www.britanialab.com/productos/604_hoja_tecnica_es.pdf.
2014-09-08.
37. **MAC FADDIN.** Biochemical tests for identification of medical bacteria. 3rd Ed. Montevideo-Uruguay. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore. 2000. Pp. 48-52.
http://www.britanialab.com/productos/327_hoja_tecnica_es.pdf.
2014-09-08.
38. **MAC FADDIN.** Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de interés biológico. 3ra Ed. Montevideo-Uruguay. Médica Panamericana. 2003. p. 850.
<https://www.seimc.org/.../seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf>
2014-09-15.
39. **MADIGAN Michael., et al.** Biología de los microorganismos. 9na Ed. Madrid-España. Prentice Hall. 2000. p. 1064.
<http://www.casadellibro.com/libro-brock-biologia-de-los-microorganismos-10-ed/978842>.
2014-09-15
40. **MAHON, Connie & MANUSELIS, George.** Textbook and Diagnostic Microbiology. 2nd. Ed. New York-United States of America. Saunders Company. 2000. Pp. 124-128.
http://www.amazon.com/Textbook-Diagnostic-Microbiology-2nd-Second/dp/B0088OWI6_
2014-09-15
41. **MARTEINSSON, Viggó., et al.** Phylogenetic diversity analysis of subterranean hot springs in Iceland. Cataluña-España. Applied and Environmental Microbiology. 2001. Pp. 4242-4248.
<http://revistes.iec.cat/index.php/IM/article/view/10018/10084>.
2014-08-27.
42. **MICROBIOLOGÍA, 3M.** Placas Petrifilm para recuento de Aerobios. California-Estados Unidos de América. Saunders Company. 2014. pp. 1-6.
http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/PetrifilmAerobiccount_19100.pdf.
2014-09-15

43. **MILLER, Stanley & y LASCANO, Antonio.** The origin of life did it occur at high temperatures. Los Angeles-United States of America. J. Mol. Evol. 1995. Pp. 689-692.
<http://physwww.mcmaster.ca/~higgsp/3D03/MillerHighTemp.pdf>
2014-08-13
44. **SAKO, Tomohisa.** *Rhodothermus obamensis* sp. nov., a modern lineage of extremely thermophilic marine bacteria. Barcelona-España. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 1996. Pp. 1099-1104.
<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.318.9336&rep=rep1&type=pdf>
2014-08-27.
45. **SLOBODKIN, Anna., et al.** *Thermoterrabacterium ferrireducens* gen. nov., sp. nov., a thermophilic anaerobic dissimilatory Fe (III) reducing bacterium from a continental hot spring. Murcia-España. Int. J. Syst. Bacteriol. 1997. Pp. 541-547.
http://www.researchgate.net/profile/Juergen_Wiegel2/publication/6772702.nov.sp.nov.pdf
2014-09-08
46. **VIZCARRODO, Antonia & GUTIÉRREZ, Sofía.** Morfología y Tinción de los Microorganismos. Caracas-Venezuela. Laboratorio de Microbiología. Universidad Central de Venezuela. 2008. Pp. 2-7.
http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/Programa_Microbiolog%C3%ADa_2008.pdf
2014-09-22.
47. **WAGNER Michael, et al.** Phylogeny of dissimilatory sulfite reductases supports and early origin of sulfate respiration. Munich-Germany. J.Bacteriol. 1998. Pp. 2975-2982.
www.genomed-dna.com/literatur/63.pdf
2014-08-13
48. **ANDRADE Carolina., et al.** *Revista de Microbiologia.* Extremely thermophilic microorganisms and their polymer-hydrolytic enzymes. Vol. N° 30. Rio de Janeiro-Brasil. 1999. Pp. 287-298.
http://shodhganga.inflibnet.ac.in/bitstream/10603/1015/16/16_chapter%206.pdf
2014-08-27.

49. **BRELS, Stalin., et al.** Publication seriate. CBD Technical Series No. 40. Tran's boundary water resources management. Montreal-Canada. The role of international watercourse agreements in implementation of the CBD. 2008. p. 340.
<http://www.cbd.int/doc/publications/cbd-ts-40-en.pdf>.
2014-08-13
50. **DIAZ, Paula., et al.** Aislamiento de bacterias Gran negativas termófilas autóctonas de manantiales termales de Iza, Boyacá. Tesis de Pregrado. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Microbiología. Bogotá-Colombia. 1998. Pp. 40-49.
<http://javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis249.pdf>
2014-08-21.
51. **PANCHON, Liliana & POSADA, Yully.** Cuantificación de poblaciones anaerobias aminoacidolíticas y amilolíticas de un yacimiento termal de Paipa, Boyacá. Tesis de Pregrado. Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Microbiología. Bogotá-Colombia. 2003. Pp. 23-36.
www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis128.pdf
2014-09-08
52. **PEDROZA, Aura.** Aislamiento y caracterización de dos cepas de *Thermus sp.* con actividad amilolítica termoestable. Tesis de Maestría. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Microbiología. Bogotá-Colombia. 2001. pp. 23-46.
<http://www.redalyc.org/pdf/499/49911595008.pdf>.
2014-08-27.
53. **SUÁREZ, Margaret.** Estudio de las propiedades químico físicas y terapéuticas de algunas aguas mineromedicinales. Tesis de Diploma Universitario. Facultad de Farmacia. Universidad de La Habana. La Habana-Cuba. 1998. Pp. 22-48.
http://aguas.igme.es/igme/publica/pdfjor_aguas_mine/8_aguas.pdf.
2014-08-13

ANEXOS

ANEXO A: Muestreo en ojo de agua y piscina de las Termas “La Virgen”



Fuente: SORIA, Arturo. 2015.

ANEXO B: Almacenamiento y Transporte de muestras.



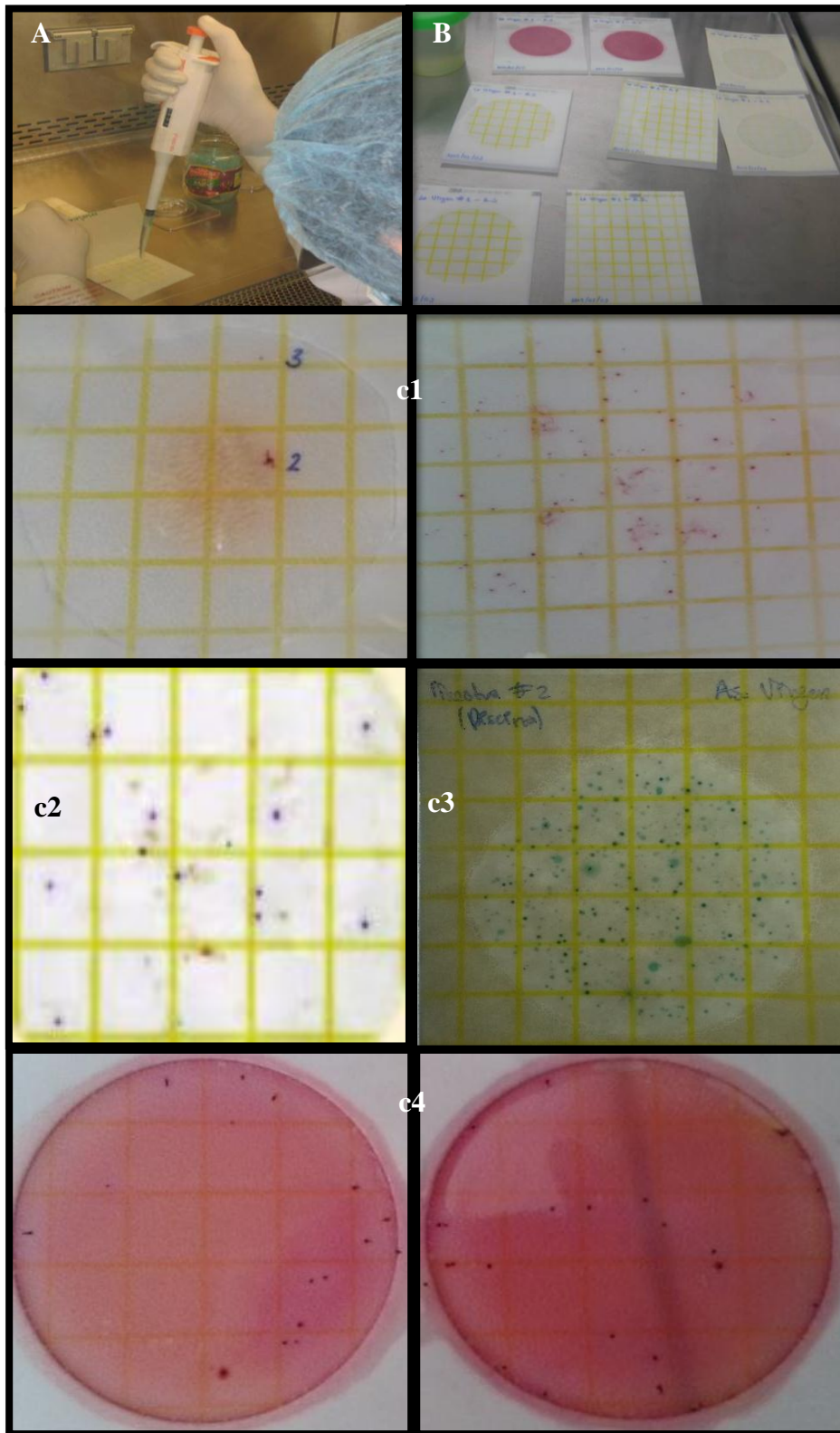
Fuente: SORIA, Arturo. 2015.

ANEXO C: Pruebas In Situ con ayuda del multiparámetro.



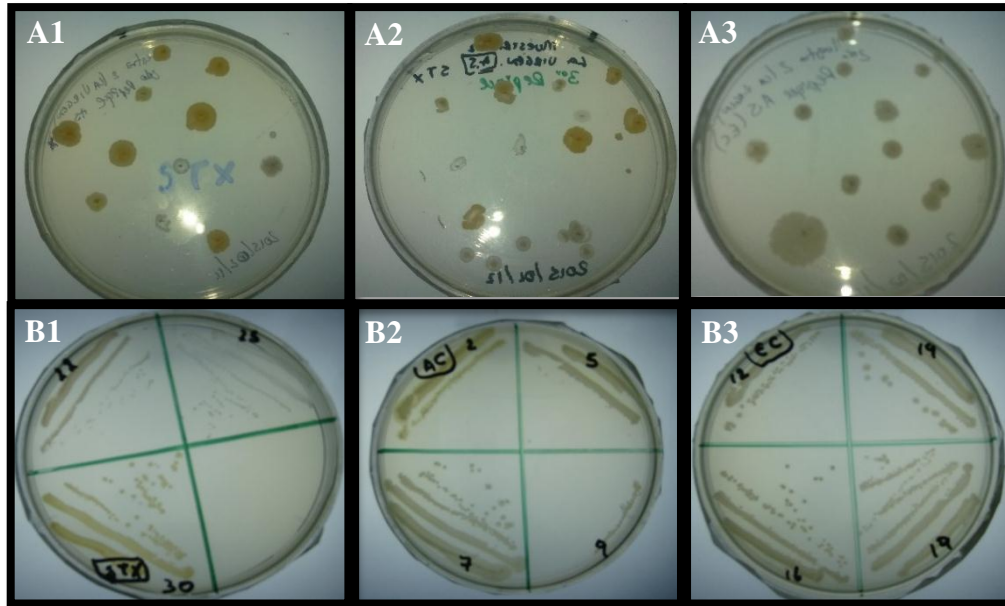
Fuente: SORIA, Arturo. 2015.

ANEXO D: A) Siembra, B) Incubación y C) Contaje En Petrifilm; c1) Aerobios Mesófilos, c2) Staph Express, c3) Mohos y Levaduras, c4). Coliformes.



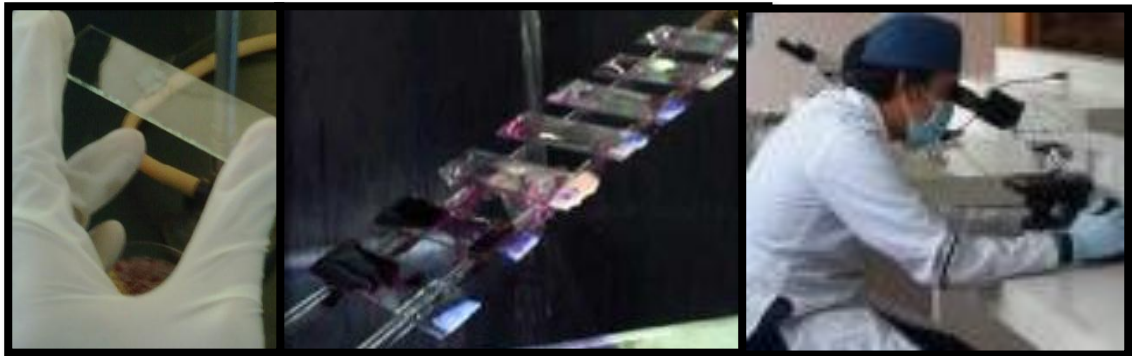
Fuente: SORIA, Arturo. 2015.

ANEXO E: A) Repiques y B) Siembra en Agar Müller Hilton.



Fuente: SORIA, Arturo. 2015.

ANEXO F: Tinción Gram; fijación, coloración y observación al microscopio.



Fuente: SORIA Arturo. 2015.

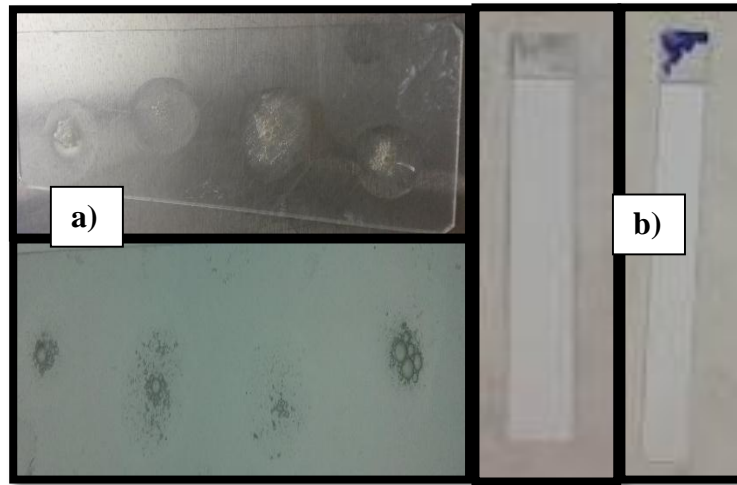
ANEXO G: Tinción Gram; a) bacilos Gram negativos.

b) bacilos Gram positivos y c) cocos Gram Positivos



Fuente: SORIA, Arturo 2015.

ANEXO H: Pruebas. a) Catalasa y b) Oxidasa.

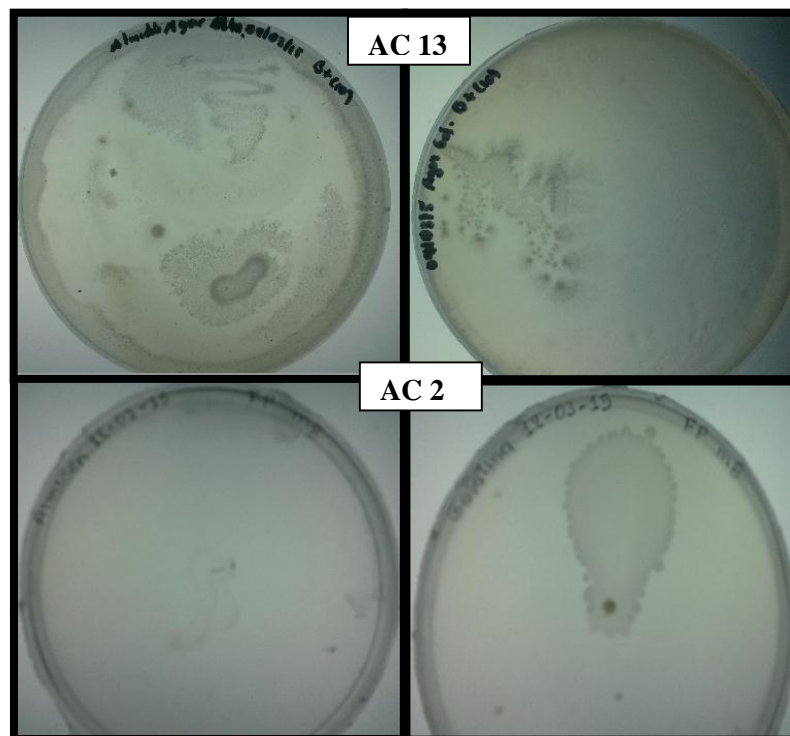


Fuente: SORIA, Arturo. 2015.

ANEXO I: Hidrolisis de Almidón Y Gelatina.

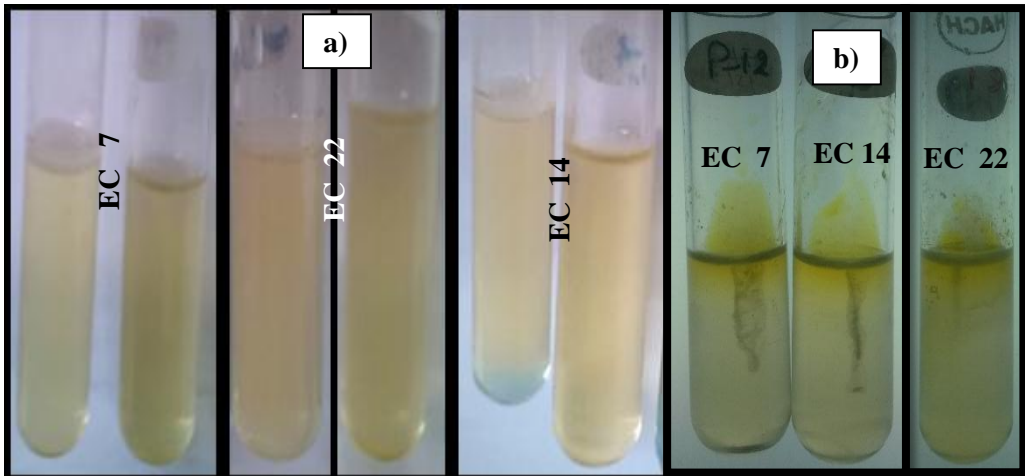
Almidón (+) y Gelatina (-) en AC 13 (*Bacillus* spp.)

Almidón (+) y Gelatina (+) en AC 2 (*Bacillus coagulans*.)



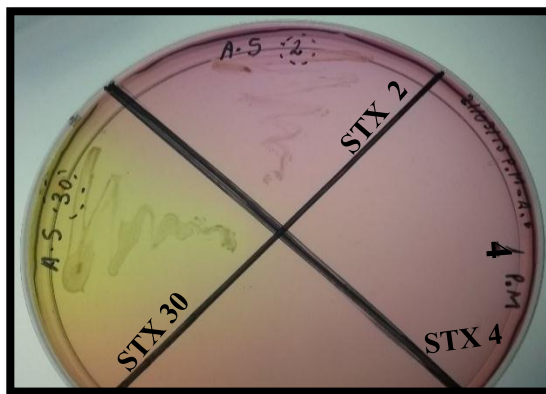
Fuente: SORIA, Arturo. 2015.

ANEXO J: Pruebas. a) Fermentación y b) Movilidad.



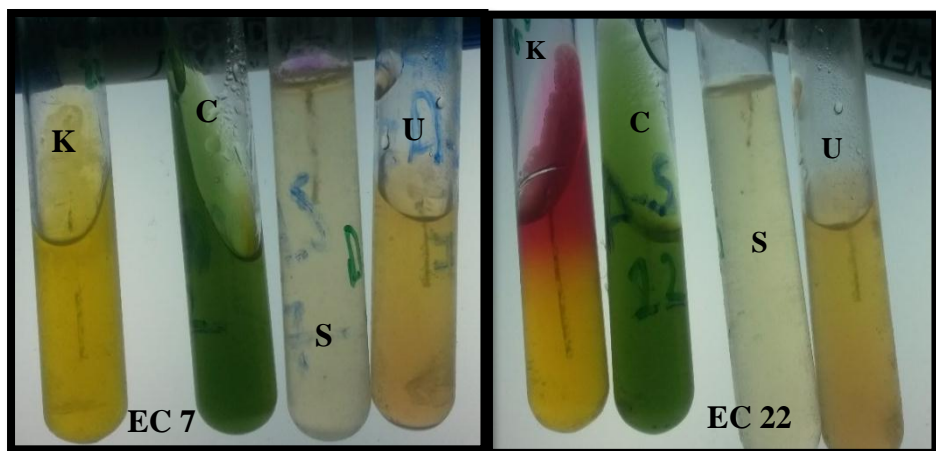
Fuente: SORIA, Arturo. 2015.

ANEXO K: Siembra en Agar Manitol Salado.



Fuente: SORIA, Arturo. 2015.

ANEXO L: Siembra en Kligler, Citrato, Sim Y Ureasa.



Fuente: SORIA, Arturo. 2015.