



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

**“ESTUDIO MICROBIOLÓGICO DE LAS AGUAS  
TERMOMEDICINALES DEL PARQUE ACUÁTICO LOS  
ELENES, CANTÓN GUANO, PROVINCIA CHIMBORAZO”**

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCION DEL GRADO  
ACADÉMICO DE “BIOQUÍMICA FARMACEÚTICA”**

**AUTOR: EVELYN PATRICIA OCAÑA BONIFAZ**  
**TUTOR: DRA. SANDRA ESCOBAR**

**RIOBAMBA-ECUADOR**

**2015**

# **ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

## **FACULTAD DE CIENCIAS**

### **ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

El tribunal de Tesis certifica que: El trabajo de investigación: “ESTUDIO MICROBIOLÓGICO DE LAS AGUAS TERMOMEDICINALES DEL PARQUE ACUÁTICO LOS ELENES, CANTÓN GUANO, PROVINCIA CHIMBORAZO” de responsabilidad de la señorita egresada Evelyn Patricia Ocaña Bonifaz, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

**FIRMA**

**FECHA**

Dra. Sandra Escobar

**DIRECTORA DE TESIS**

.....

.....

Dr. Gerardo Medina

**MIEMBRO DE TRIBUNAL**

.....

.....

**NOTA DE TRABAJO ESCRITO.....**

.....

**COORDINADOR SISBIB ESPOCH**

Yo, Evelyn Patricia Ocaña Bonifaz, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta tesis, y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado, pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO.

Evelyn Patricia Ocaña Bonifaz

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco infinitamente a Dios por haberme dado las fuerzas necesarias para no rendirme y culminar mi carrera exitosamente.

A mis padres y hermanos por apoyarme de manera incondicional a lo largo de toda mi vida.

A mi princesa Elisita Amelié por inspirarme a luchar constantemente.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por abrirme sus puertas y brindarme la formación necesaria para hacer de mí una profesional comprometida a trabajar por la sociedad.

Al Laboratorio de Análisis Bioquímicos y Bacteriológicos de la Escuela de Bioquímica y Farmacia y su Equipo de Trabajo por ayudarme permanentemente con sus conocimientos e instalaciones.

A la Dra. Sandra Escobar por su tiempo, asesoramiento y colaboración en la dirección de este Proyecto de Tesis.

Al Dr. Gerardo Medina Miembro del Tribunal y al Dr. Félix Andueza por su aporte desmedido de conocimientos para la elaboración de este trabajo.

A Pedro por todo su cariño, a mis amigos Fernanda, Vanesa, Raúl y a todas aquellas personas que de una u otra manera colaboraron para la culminación de este proyecto.

Evelyn

## **DEDICATORIA**

A Dios, fuera, inspiración, sabiduría, amor y verdad.

A la Virgen María, madre buena y firme intercesora.

A mis padres y hermanos ejemplo de lucha constante, superación, apoyo y unidad.

A Pedro y Amelié, amores y motores de mi vida.

Evelyn

## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	xii
SUMMARY.....	xiii
INTRODUCCIÓN.....	1
<b>CAPITULO I</b>	
<b>MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>3</b>
<b>1.1. Antecedentes de la Investigación.....</b>	<b>3</b>
<b>1.2. El Agua .....</b>	<b>6</b>
<i>1.2.1. Definición y características .....</i>	<i>6</i>
<i>1.2.2. Tipos de agua.....</i>	<i>7</i>
<i>1.2.3. Microbiología del agua.....</i>	<i>7</i>
<i>1.2.3.1. Microbiología.....</i>	<i>7</i>
<i>1.2.3.2. Microorganismos.....</i>	<i>8</i>
<i>1.2.3.3. Crecimiento microbiano.....</i>	<i>9</i>
<i>1.2.3.4. Medios de cultivo.....</i>	<i>11</i>
<i>1.2.3.5. Placas petrífilm .....</i>	<i>14</i>
<i>1.2.3.6. Observación bacteriana .....</i>	<i>16</i>
<i>1.2.3.7. Diferenciación Bacteriana .....</i>	<i>17</i>
<i>1.2.3.8. Sistemas de Identificación Bioquímica Microgen .....</i>	<i>23</i>
<i>1.2.3.8. Microorganismos presentes en aguas naturales .....</i>	<i>23</i>
<b>1.3. Aguas Termales, Termomedicinales o Termominerales .....</b>	<b>29</b>
<i>1.3.1. Definición .....</i>	<i>29</i>
<i>1.3.2. Origen .....</i>	<i>29</i>
<i>1.3.3. Características .....</i>	<i>30</i>
<i>1.3.4. Clasificación de las Aguas Termales .....</i>	<i>31</i>
<i>1.3.4.1. Clasificación Geológica- Genética .....</i>	<i>31</i>
<i>1.3.4.2. Clasificación por su Temperatura.....</i>	<i>32</i>
<i>1.3.5. Clasificación por su composición química .....</i>	<i>32</i>
<i>1.3.6. Clasificación según residuo seco .....</i>	<i>32</i>
<i>1.3.7. Clasificación por su salinidad.....</i>	<i>33</i>
<i>1.3.8. Clasificación según la acción terapéutica .....</i>	<i>33</i>
<i>1.3.5. Microbiología de las aguas termomedicinales .....</i>	<i>34</i>
<i>1.3.5.1. Microorganismos Autóctonos.....</i>	<i>34</i>

1.3.5.2. <i>Microorganismos Alóctonos</i> .....	35
<b>1.3.6. Las Aguas Termominerales en el Ecuador</b> .....	35
1.3.6.1. <i>Aguas Termales “Los Elenes”</i> .....	37
1.3.6.2. <i>Características</i> .....	37
<b>CAPITULO 2</b>	
<b>METODOLOGÍA</b> .....	39
<b>2.1. Población de estudio y localización del muestreo</b> .....	39
<b>2.2. Metodología</b> .....	39
2.2.1. <i>Muestreo</i> .....	39
2.2.2. <i>Pruebas Físico- Químicas in situ (Temperatura, pH, Conductividad y Solidos totales)</i> .....	40
2.2.3. <i>Análisis Microbiológico</i> .....	40
2.2.3.1. <i>Siembra en placas petrifilm</i> .....	40
2.2.3.2. <i>Descripción macroscópica de colonias</i> .....	41
2.2.3.3. <i>Estabilización del aislado bacteriano</i> .....	41
2.2.3.4. <i>Tinción Gram</i> .....	42
2.2.3.5. <i>Prueba de la Oxidasa</i> .....	43
2.2.3.6. <i>Producción de catalasa</i> .....	43
2.2.3.7. <i>Oxidación- fermentación de la glucosa</i> .....	43
2.2.3.8. <i>Observación de la movilidad</i> .....	44
2.2.3.9. <i>Hidrolisis de almidón</i> .....	44
2.2.3.10. <i>Hidrolisis de Gelatina</i> .....	45
2.2.3.11. <i>Pruebas Bioquímicas: Kligler, SIM, Urea y Citrato</i> .....	45
2.2.3.12. <i>Identificación de bacterias</i> .....	48
2.2.3.13. <i>Identificación de bacterias mediante el Sistema de Identificación Bioquímica Microgen™</i> .	51
<b>CAPITULO 3</b>	
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	55
<b>3.1. Pruebas físico- químicas In Situ</b> .....	55
<b>3.2. Análisis Microbiológico</b> .....	56
3.2.1. <i>Análisis de Bacterias Aerobias Mesófilas</i> .....	57
3.2.2. <i>Análisis de Coliformes Totales y Fecales</i> .....	58
3.2.3. <i>Análisis de Staphylococcus</i> .....	59
3.2.4. <i>Análisis de Mohos y Levaduras</i> .....	60
3.2.5. <i>Bacterias Gram Positivas y Gram Negativas</i> .....	61
3.2.6. <i>Bacterias Fermentadoras, Oxidativas e Inertes</i> .....	62

3.2.7. <i>Pruebas realizadas</i> .....	63
3.2.8. <i>Bacterias Identificadas por Pruebas Bioquímicas</i> .....	66
3.2.9. <i>Bacterias identificadas por Sistema Microgen</i> .....	68
3.2.9. <i>Total de Bacterias Identificadas</i> .....	69
<b>CONCLUSIONES</b> .....	70
<b>RECOMENDACIONES</b> .....	71
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	
<b>ANEXOS</b>	

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>CUADRO 1-1:</b>	Descripción de los principales tipos de agua.....	7
<b>CUADRO 2-1:</b>	Clasificación de las bacterias según sus requerimientos.....	9
<b>CUADRO 3-1:</b>	Clasificación de los microorganismos según la temperatura.....	10
<b>CUADRO 4-1:</b>	Clasificación de los microorganismos según pH.....	10
<b>CUADRO 5-1:</b>	Métodos usados para determinar el crecimiento microbiano.....	11
<b>CUADRO 6-1:</b>	Diferenciación de bacterias de interés clínico en base a la coloración Gram.....	18
<b>CUADRO 7-1:</b>	Características generales de <i>Escherichia coli</i> .....	26
<b>CUADRO 8-1:</b>	Características generales del Género <i>Cedecea</i> y <i>Cedecea especie 5</i> .....	27
<b>CUADRO 9-1:</b>	Características generales del Género <i>Vibrio</i> .....	28
<b>CUADRO 10-1:</b>	Clasificación de las aguas Termominerales por su salinidad.....	33
<b>CUADRO 11-1:</b>	Clasificación de las aguas minerales, según Barabino Amadeo.....	33
<b>CUADRO 12-1:</b>	Clasificación de las aguas termales del Ecuador según su composición química.....	36
<b>CUADRO 13-1:</b>	Clasificación de aguas termales y minerales del Ecuador por su temperatura.....	36
<b>CUADRO 14-1:</b>	Información Básica y Características de las aguas termales de Los Elenes.....	37

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>TABLA 1-3:</b>	Análisis físico- químico in situ.....	55
<b>TABLA 2-3:</b>	Recuento de Bacterias Aerobias Mesófilas.....	57
<b>TABLA 3-3:</b>	Recuento de Coliformes totales y fecales.....	58
<b>TABLA 4-3:</b>	Recuento de <i>Staphylococcus</i> .....	59
<b>TABLA 5-3:</b>	Recuento de Mohos y Levaduras.....	60
<b>TABLA 6-3:</b>	Recuento de bacterias Gram positivas y Gram negativas.....	61
<b>TABLA 7-3:</b>	Número de bacterias fermentadoras, Oxidativas e Inertes.....	62
<b>TABLA 8-3:</b>	Descripción completa de pruebas realizadas.....	64
<b>TABLA 9-3:</b>	Bacterias identificadas luego de realizar las pruebas descritas en la tabla 7-3.....	66
<b>TABLA 10-3:</b>	Bacterias identificadas por sistema Microgen <sup>TM</sup> GnA+B-ID.....	68
<b>TABLA 11-3:</b>	Bacterias identificadas según sitio de muestreo y placa petrifilm.....	69

## ÍNDICE DE IMÁGENES

<b>IMAGEN 1-1:</b>	Morfología de las Bacterias.....	8
<b>IMAGEN 2-1:</b>	Caracteres observables más importantes de una colonia en medio sólido.....	16
<b>IMAGEN 3-1:</b>	Esquema de identificación de los microorganismos más usados en laboratorio..	21
<b>IMAGEN 4-1:</b>	Clave diferencial de las especies de la familia <i>Enterobacteriaceae</i> .....	22
<b>IMAGEN 5-1:</b>	Origen de las aguas termominerales.....	30
<b>IMAGEN 6-1:</b>	Ubicación de las Aguas Termales Los Elenes.....	37
<b>IMAGEN 7-1:</b>	Análisis realizados por el INAMHI en las Aguas Termales de Los Elenes.....	38
<b>IMAGEN 1-2:</b>	Esquema del proceso de análisis microbiológico.....	39
<b>IMAGEN 2-2:</b>	Instrucciones de uso de Placas Petrifilm.....	40
<b>IMAGEN 2-3:</b>	Extendido de placa por agotamiento.....	42
<b>IMAGEN 2-4:</b>	Características para diferenciación de especies de la familia <i>Enterobacteriaceae</i>	49
<b>IMAGEN 2-5:</b>	Segunda etapa diferenciación de especies de la familia <i>Enterobacteriaceae</i> .....	50
<b>IMAGEN 2-6:</b>	Características para la diferenciación del género <i>Vibrio</i> .....	51
<b>IMAGEN 2-7:</b>	Tabla de colores Microgen™ GnA+B-ID System.....	52
<b>IMAGEN 2-8:</b>	Ejemplo de la hoja de resultados de Microgen.....	52
<b>IMAGEN 2-9:</b>	Esquema de Identificación Bacteriana de las Aguas “Los Elenes” (muestra 1)..	53
<b>IMAGEN 2-10:</b>	Esquema de Identificación Bacteriana de las Aguas “Los Elenes” (muestra 2)..	53

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

<b>GRÁFICA 1-3:</b>	Recuento de Bacterias Aerobias Mesófilas.....	57
<b>GRÁFICA 2-3:</b>	Recuento de Coliformes totales y fecales.....	58
<b>GRÁFICA 3-3:</b>	Recuento de <i>Staphylococcus</i> .....	59
<b>GRÁFICA 4-3:</b>	Recuento de Mohos y Levaduras.....	60
<b>GRÁFICA 5-3:</b>	Porcentaje de bacterias Gram positivas y Gram negativas.....	61
<b>GRÁFICA 6-3:</b>	Porcentaje de bacterias fermentadoras, Oxidativas e Inertes.....	62
<b>GRÁFICA 7-3:</b>	Porcentaje de Bacterias identificadas luego de realizar las pruebas bioquímicas	66
<b>GRÁFICA 8-3:</b>	Porcentaje de bacterias identificadas por sistema Microgen™.....	68
<b>GRÁFICA 9-3:</b>	Porcentaje final de Bacterias identificadas.....	69

## RESUMEN

Se realizó el Estudio Microbiológico de las Aguas Termomedicinales del Parque Acuático Los Elenes, del Cantón Guano, Provincia Chimborazo, para determinar la calidad microbiológica del manantial y garantizar la salud de quienes acuden a este balneario. El estudio se inició con la medición de los factores físico- químicos del afluente, usando el multiparámetro de Hannah. El análisis microbiológico se realizó con 2 muestreos del ojo de agua y de la piscina, bajo la Norma INEN 1105. Aguas. Muestreo para examen microbiológico. La identificación microbiana se realizó en placas Petrifilm de Aerobios, *E. coli/ Coliformes*, *Staphylococcus*, mohos y levaduras, usando 1mL de muestra en cada una. Luego de crecidas las colonias, se eligieron a las más representativas para efectuar los repiques necesarios hasta obtener clones puros a los que se les realizó una tinción Gram y las pruebas bioquímicas: oxidasa, catalasa, movilidad y Oxido fermentación, a más de ello las bacterias Gram positivas se inocularon en almidón y gelatina. Para las bacterias que no pudieron ser identificadas se continuó con las pruebas de Kligler, Citrato, Urea y SIM (Sulfuro Indol Movilidad). Y Finalmente las cepas que pese a todos los estudios seguían sin ser identificadas se sometieron al sistema Mycrogen. El análisis dio como resultado un ojo de agua libre de bacterias, en la piscina hubo un 33% de bacterias Gram positivas género *Bacillus spp* y 67% de bacterias Gram negativas género *Enterobacteriaceae*, con especies *Escherichia coli* y *Cedecea* especie 5, y género *Vibrio*, con especie *Vibrio alginolyticus*. Determinando con ello que en estas aguas existe un predominio de bacterias Gram negativas patógenas de interés sanitario, consideradas como indicadores de posibles contaminaciones humanas y ambientales. Se recomienda al GAD municipal del cantón Guano contratar profesionales que se encarguen de realizar análisis microbiológicos constantes para controlar los parámetros de calidad del agua de Los Elenes, protegiendo así la salud de los bañistas que acuden a este complejo turístico.

### Palabras claves:

<AGUAS TERMALES> <TEMPERATURA DEL AGUA> <MICROBIOLOGÍA DEL AGUA>  
<MICROORGANISMOS DEL AGUA> <CALIDAD DEL AGUA>

## SUMMARY

The Microbiological Study of the Thermo Medicinal Water in the “Los Elenes” Aquatic Park, in Guano, Chimborazo Province was performed in order to determine the microbiological quality of the spring water and ensure the health resort visitors. The study began with the water source physical and chemical factors control, using the Hannah multiparameter. The microbiological analysis was made with two samples, the water source and swimming pool, with the INEN 1105 Standard. Water Sampling for microbiological examination. The microbial identification was conducted on Aerobic Petrifilm plates, *E. coli/ coliform*, *Staphylococcus*, mold and yeast, using 1mL of sample each. After the colonies expanded, the most representative were chosen to make the necessary changes to obtain pure clones which were put through Gram staining and biochemical tests: oxidase, catalase, motility and Oxide fermentation, in addition, the Gram positive bacteria were inoculated into starch and gelatin. For those bacteria which could not be identified, the Kligler, citrate, urea and SIM (Sulfide Indole Movility) tests were applied. Finally, the strains which despite all the studies were still not identified were submitted to Mycrogen system. The analysis led to a free bacteria water source, in the pool there was 33% Gram positive gender *Bacillus spp* bacteria and 67% Gram negative gender *Enterobacteriaceae* bacteria, with *Escherichia coli* and *Cedecea* species 5, and gender *Vibrio* with *Vibrio algilolyticus*. Thereby determining that in this water there is a predominance of Gram negative pathogenic bacteria of sanitary interest considered as indicators of potential human and environmental contamination. It is recommended to the GAD Guano to hire professionals in charge of making permanent microbiological analysis to control the water quality parameters in Los Elenes, in order to protect the swimmers, who visit the resort, health.

### Key Words:

<THERMAL WATER> <WATER TEMPERATURE> < WATER MICROBIOLOGY> < WATER MICROORGANISMS> < WATER QUALITY>

## INTRODUCCIÓN

El estudio de los microorganismos presentes en el agua comenzó hace ya varios años teniendo como objetivo el análisis de bacterias patógenas para controlar las enfermedades transmitidas por este medio.

Los conocidos balnearios termales están dentro de los principales lugares donde hay que tener un extremo cuidado con el agua, estos sitios públicos están dispersados por el mundo entero, y prestan un servicio turístico con piscinas innegablemente relajantes, pero donde nadie nos da garantía de su calidad sanitaria.

El Ecuador por estar ubicado en el cinturón de fuego del Pacífico, es un país muy rico en aguas termales y minerales, pero no existe un reglamento que normalice sus parámetros de calidad, y lo que es más, el uso que se hace de ellas a nivel investigativo es casi nulo. (BURBANO, Napoleón., et al. 2013. p.5).

Tomando en cuenta que cada agua termal tiene características físicas, químicas y microbiológicas propias, es importante realizar sus estudios, pues así se puede detectar posibles contaminaciones accidentales ya sean microbiológicas o químicas, conocer sus causas y por lo tanto proporcionar acciones correctivas en caso de ser necesario, ya que es prioritario proponer este tema para quienes manejan estos establecimientos, puesto que al contar con aguas de calidad, estas microempresas podrán seguir funcionando y prestar un servicio seguro que garantice la salud de sus usuarios, enmarcándose en el Plan del Buen vivir que rige la Constitución de nuestro país.

Además de ello, al iniciar estudios en nuestras aguas termales se podrá aprovechar mejor este recurso mineral que es quizá el más preciado del nuevo milenio, más aun cuando alrededor del mundo ya se han iniciado estudios sobre la microbiota de manantiales termales que están cambiando la visión de la biodiversidad microbiana, su composición, estructura, función y su importancia con fines terapéuticos, estudios que nos dan la pauta para iniciar este tipo de análisis aquí en el país, donde existen documentadas 167 manantiales de aguas termales y minerales abriendo un espacio a quienes formamos parte de las facultades de Química y Medicina de las universidades del país. (PALADINES: [www.geologiaecuador.com/2011/04/aguas-termales-minerales-y-naturales-de.html](http://www.geologiaecuador.com/2011/04/aguas-termales-minerales-y-naturales-de.html)).

Debido a ello este estudio se realizará en uno de los balnearios más concurridos de la zona 3- Centro de nuestro país, el parque acuático Los Elenes, donde tenemos un manantial de aguas hipotermales que

brotan de la Peña de Langos ubicada en el cantón Guano provincia de Chimborazo, del cual se benefician no solo los 42.851 habitantes de este cantón, sino un porcentaje de la población de la ciudad de Riobamba, y también quienes habitan las comunidades aledañas de Yungan Los Elenes, Olte San Pedro, Langos San Alfonso, Langos San Pedro y Langos Panamericana. (AME: <http://www.ame.gob.ec/ame/index.php/ley-de-transparencia/65-mapa-cantones-del-ecuador/mapa-chimborazo/263-canton-guano>).

Dicho análisis nos permitirá determinar la diversidad microbiana que poseen estas aguas, dándonos la oportunidad de no solo descifrar su calidad sanitaria, sino también encontrar microorganismos desconocidos que formen parte de la biodiversidad de nuestro país, y cuyas actividades puedan ser potenciadas a nivel industrial. Además de ello, se podrá capacitar a quienes administran este balneario, tomar medidas correctivas para disminuir la flora microbiana autóctona y alóctona de sus aguas, y lo que es más se abre la brecha para que futuros investigadores ahonden en el tema y se logre obtener por fin una legislación que avale la administración eficiente de las Aguas termales del Ecuador.

## CAPITULO I

### MARCO TEÓRICO

#### 1.1. Antecedentes le La Investigación

El estudio microbiológico del agua inició en el siglo XIX con el objetivo de estudiar bacterias patógenas para poder controlar enfermedades transmitidas por este medio. (LÓPEZ, Juan. 2000. p.21).

En 1838 en España, el farmacéutico Pablo Prolongo realiza una descripción de la naturaleza orgánica de los copos localizados en las aguas termominerales de Carratraca., denominándolos *Sulfuraria carratraquense*. (DE LA ROSA, María. 2000. p. 154).

En 1882 el Dr. Eduardo Moreno realizo estudios de las aguas de varios balnearios encontrando en ellas bacterias Sulfurarias, algas y hongos. Convirtiéndose así en el promotor de este análisis. (DE LA ROSA, María. 2000. p. 154).

En 1897 el Dr. Santiago García realizo estudios microbiológicos en el balneario de Arbieto en Vizcaya, identificando entre los microorganismos encontrados a bacterias como *Leptothrix*, *Beggiatoa*, *Micrococcus* y *Bacillus*, y recalando además la importancia de estos estudios como complemento de los análisis químicos rutinarios. (DE LA ROSA, María. 2000. p. 155).

En 1889 D. Narciso Carbó y de Aloy elaboraron el catálogo general de las Aguas Minero- Medicinales de España y del Extranjero de antiguo uso, con indicación de su temperatura, composición y aplicaciones médicas. (DE LA ROSA, María. 2000. p. 155).

En 1992 Lucia Molto, especialista en Hidrología Medica, realizó un estudio de los tipos de aguas minero medicinales en yacimientos arqueológicos de la península Ibérica, aquí se clasificaron los yacimientos según las características y propiedades de sus aguas, así como de sus temperaturas, determinando así que se tratan de aguas sulfuradas e hipertermales. (MOLTÓ, Lucía. 1992. p.211).

En 1994 Lourdes Aguilera López, Francisco Armijo y Francisco Maraver del Departamento de Medicina Física y Rehabilitación, Hidrología Medica de la Universidad Complutense de Madrid, realizaron un estudio analítico de las aguas minero - medicinales de los Establecimientos Balnearios de la Comarca del Maresme, desde el punto de vista sanitario determinando que por su residuo seco son aguas medio minerales, por su temperatura mesotermales, por su dureza muy blandas y sus principales elementos minerales son cloruro y sodio. Características que hacen que estas aguas puedan ser utilizadas con fines terapéuticos. (AGUILERA, Lourdes., et al. 1994. p.31).

En 1998 Vendrell, M. C. y sus colaboradores hicieron un estudio de microorganismos patógenos en la Fuente termal de O Tinteiro en Ourense, España, donde se analizaron 6 muestras recolectadas en esta fuente termal y en las inmediaciones de la misma, determinando la presencia de patógenos humanos prohibidos en la legislación Española. (VENDRELL, María., et al. 1998. p.93).

En el año 2000 el Director del Laboratorio de Análisis Dr. Oliver Rodés S.A, Benito Oliver Rodés escribe sobre el Control de Calidad de las Aguas Minero- Medicinales con el objeto de proponer una reflexión a las empresas y a los responsables de los Balnearios Termales acerca de la necesidad de conocer con detalle las características de las aguas y en caso de ser necesario proveer posibles acciones correctoras. (LÓPEZ, Juan. 2000. p.153).

En el 2004 María del Carmen de la Rosa Jorge, Félix Andueza Leal y colaboradores, del Departamento de Microbiología II de la Universidad Complutense de Madrid, realizan un estudio de la Microbiología de las aguas mineromedicinales de los Balnearios de Jaraba, analizando cinco manantiales bicarbonatados, determinando que los manantiales San Vicente, Pilas y San José presentan una gran diversidad microbiana, mientras que el manantial La Peña predomina el género *Enterobacter*. No se encontraron microorganismos indicadores fecales ni patógenos, tampoco se detectaron bacterias sulfato- reductoras, actinomicetos cianobacterias ni algas. (DE LA ROSA, María., et al. 2004. p. 522).

En América también se han realizado algunos estudios de las aguas mineromedicinales. En el año 2002 Alicia Lagarto e Ingrid Bernal del Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos de Cuba realizaron un trabajo sobre la Utilización Terapéutica de las Aguas y Fangos Mineromedicinales, en donde se presenta una revisión de su uso, clasificación de las aguas, y aplicaciones terapéuticas. (LAGARTO, Alicia., & BERNAL, Ingrid. 2002. p.62).

En el año 2006 Maritza Suárez del Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología de Cuba, publica un trabajo titulado Consideraciones sobre el Control Sanitario de los Fangos Medicinales o Peloides, en el habla acerca de la importancia del uso racional de estos fangos de acuerdo con las normas vigentes de este país, presentando algunas investigaciones y proyecciones de trabajo, enfatizando la necesidad de garantizar el control sanitario que asegura la aplicación de los mismos. (SUÁREZ, Maritza. 2006. p.53).

En el año 2008, Juan Carlos San José, Presidente de la Sociedad Española de Hidrología Medica de Madrid, hace un Estudio sobre las Aguas Mineromedicinales Argentinas, donde recalca la riqueza de aguas termales de este país, e indica su localización, composición, clasificación y aplicaciones terapéuticas. (SAN JOSÉ, Juan. 2008. p.14).

A nivel nacional pocos son los estudios que se han realizado sobre las aguas minero medicinales, siendo en el año de 1975 cuando José E. Muñoz de la Universidad Central del Ecuador, realiza un estudio de las aguas termales del país y escribe por primera vez un libro titulado Aguas minerales y Termalismo Social, donde habla sobre las aguas minerales, su clasificación, el valor terapéutico del agua mineral. El valor económico y social, el termalismo social, fundamentos y aplicaciones. (PALADINES: [www.geologiaecuador.com/2011/04/aguas-termales-minerales-y-naturales-de.html](http://www.geologiaecuador.com/2011/04/aguas-termales-minerales-y-naturales-de.html)).

Posteriormente en el año de 1982 el científico alemán Teodoro Wolf publicó un libro titulado Geografía y Geología del Ecuador, en donde recalcó que el Ecuador es un país muy rico en aguas termales y minerales, pero a pesar de ello, su uso es casi nulo, no lo conocen ni sus médicos, ni son mencionadas en farmacopeas, es decir no valen nada. (PALADINES: [www.geologiaecuador.com/2011/04/aguas-termales-minerales-y-naturales-de.html](http://www.geologiaecuador.com/2011/04/aguas-termales-minerales-y-naturales-de.html)).

En el año 2011 el Dr. Agustín Paladines escribe sobre las Aguas termales, minerales y naturales de manantial en el Ecuador, indicando que existen documentados 167 manantiales de aguas termales y minerales, cuyo origen genético se da por volcanes jóvenes y sistemas de fallas y fisuras. Resalta además que se trata de un recurso que a la larga puede agotarse y que por ende se deben hacer estudios investigativos de nuestras aguas termales. Habla además de su valor terapéutico, de su valor social y económico. Y sobre los proyectos prioritarios a desarrollarse. (PALADINES: [www.geologiaecuador.com/2011/04/aguas-termales-minerales-y-naturales-de.html](http://www.geologiaecuador.com/2011/04/aguas-termales-minerales-y-naturales-de.html)).

En el 2013 Napoleón Burbano, Simón Becerra y Efrén Pasquel, miembros del INAMHI entregan una publicación titulada Aguas Termominerales en el Ecuador, con el objetivo de promover a la comunidad científica y a los responsables de su manejo un interés por mejorar la administración de estos lugares. Aquí se clasifican las fuentes inventariadas por provincias, con énfasis en los parámetros físico-químicos como temperatura, conductividad eléctrica, pH y composición iónica. Además de ello se identificó que varias fuentes termales no son manejadas con acciones que conlleven una adecuada preservación y administración, restándole valor e importancia a este recurso. (BURBANO, Napoleón., et al. 2013. p.5).

## **1.2. El Agua**

### ***1.2.1. Definición y características***

El agua conocida como el alimento esencial para los animales y el hombre, es una sustancia indispensable para la vida, es una molécula sencilla formada por un átomo de oxígeno y dos de hidrogeno, unidos por medio de enlaces polares que pueden formar puentes de hidrogeno con moléculas contiguas, lo que hace que posea elevados puntos de fusión y ebullición, características que permiten encontrarla en estado líquido a temperatura ambiente. (CARVAJAL: [www.ucm.es/data/cont/docs/458-2013-07-24-Carbajal-Gonzalez-2012-ISBN-978-84-00-09572-7.pdf](http://www.ucm.es/data/cont/docs/458-2013-07-24-Carbajal-Gonzalez-2012-ISBN-978-84-00-09572-7.pdf)).

Posee además un alto calor específico que la convierte en un amortiguador y regulador de los cambios térmicos, manteniendo constante la temperatura corporal. Por su alto valor del calor de vaporización permite eliminar mediante el sudor grandes cantidades de calor, y además de ello casi la todas las reacciones químicas que ocurren en nuestro cuerpo se realizan en medio acuoso. (CARVAJAL: [www.ucm.es/data/cont/docs/458-2013-07-24-Carbajal-Gonzalez-2012-ISBN-978-84-00-09572-7.pdf](http://www.ucm.es/data/cont/docs/458-2013-07-24-Carbajal-Gonzalez-2012-ISBN-978-84-00-09572-7.pdf)).

Pero este líquido no solo lo usamos dentro de nuestro cuerpo, sino que es el que nos sirve para nuestro aseo continuo, y el aseo de todo lo que nos rodea como alimentos, ropa y cualquier objeto que queremos tener limpio previo al contacto con nosotros. Es decir simplemente sin agua no hay vida. (CARVAJAL: [www.ucm.es/data/cont/docs/458-2013-07-24-Carbajal-Gonzalez-2012-ISBN-978-84-00-09572-7.pdf](http://www.ucm.es/data/cont/docs/458-2013-07-24-Carbajal-Gonzalez-2012-ISBN-978-84-00-09572-7.pdf)).

### 1.2.2. Tipos de agua

Existen varios tipos de agua, pero entre los principales tenemos los mencionados en el cuadro 1-1.

**Cuadro 1-1:** Descripción de los principales tipos de agua.

Tipo de agua	Descripción
Agua potable	Agua apta para el consumo humano y de animales.
Agua salada	Agua en la que la concentración de sales es mayor a 10 000 mg/L.
Agua dulce	Agua con baja concentración de sales, considerada para convertirse en potable previo tratamiento.
Agua dura	Agua que contiene un alto número de iones positivos, relacionado a la cantidad de átomos de calcio y magnesio presentes en su composición.
Agua blanda	Agua que posee sales disueltas en mínimas cantidades.
Aguas grises	Aguas domésticas residuales, procedente del lavado de cocinas, baños, aguas de fregaderos y lavaderos.
Aguas residuales	Aguas procedentes del sistema de alcantarillado.
Agua bruta	Agua que no ha recibido ningún tipo de tratamiento.
Aguas muertas	Agua en estado de nula circulación, con déficit de oxígeno.
Agua de suelo	Agua ubicada en la parte superior del suelo, de manera que puede ser cedida a la atmósfera mediante evapotranspiración.
Agua superficial	Agua natural abierta a la atmósfera, es decir agua de ríos, lagos, charcas, océanos, estuarios, humedales y mares.
Agua fósil	Agua infiltrada en un acuífero en épocas antiguas, bajo condiciones climáticas y morfológicas diferentes a las actuales.
Agua magmática	Agua ubicada a gran profundidad, impulsada hacia la superficie terrestre por el movimiento de rocas ígneas intrusivas.
Agua subterránea	Agua encontrada en la zona saturada del suelo

Realizado por: Evelyn Ocaña

Fuente: <http://www.cuidoelagua.org/empapate/origendelagua/tiposagua2.html>

### 1.2.3. Microbiología del agua

#### 1.2.3.1. Microbiología

En general la microbiología es la rama de la biología encargada del estudio de los organismos de tamaño microscópico. En el ámbito sanitario esta ciencia se centra en el estudio de los microorganismos capaces de producir enfermedades, es decir estudia las relaciones morfología-estructura, composición, función microbiana y las alteraciones que producen los microbios en humanos. (DE LA ROSA, Manuel., et al. 2011. p.1).

### 1.2.3.2. Microorganismos

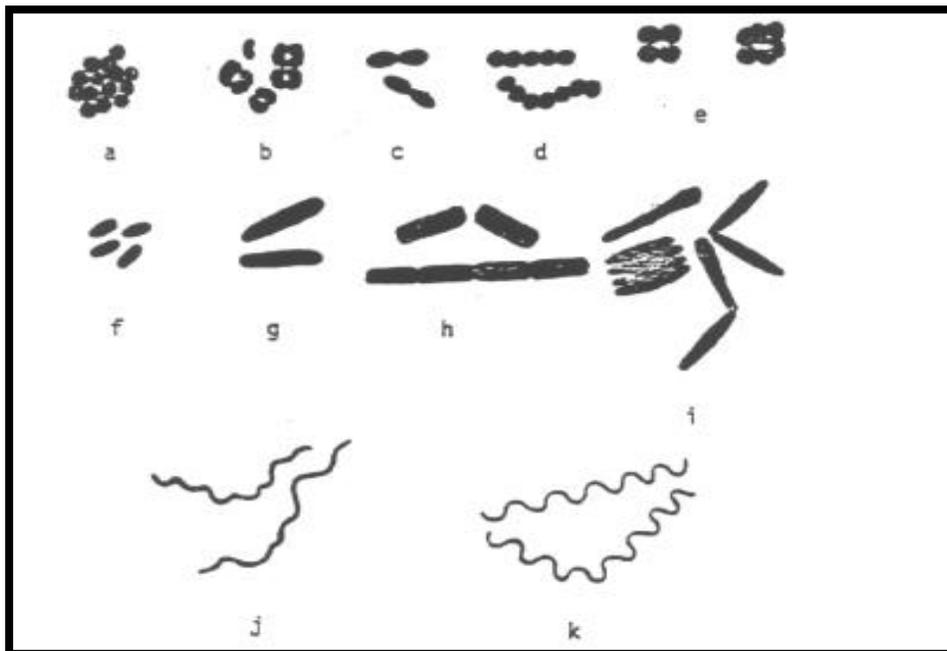
Los microorganismos son seres diminutos que únicamente pueden ser observados con la ayuda de un microscopio. Estos pueden ser células de tipo eucariota, si poseen membrana y organelos, como es el caso de hongos y algas; o de tipo procariota, si su estructura interna es más sencilla como es el caso de las bacterias. (DE LA ROSA, Manuel., et al. 2011. p.2).

#### *Morfología bacteriana*

Las bacterias son seres unicelulares que se reproducen por bipartición, su tamaño puede variar desde un diámetro de 0,2  $\mu\text{m}$  como un micoplasma hasta uno de 40  $\mu\text{m}$  como la *Beggiatoa gigantea*. (APELLA & ARAUJO: [www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02\\_Capitulo\\_02.pdf](http://www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02_Capitulo_02.pdf)).

La morfología de una bacteria está determinada por la rigidez de su pared celular, teniendo así las de forma esférica conocidas como cocos, las de forma de bastón alargado conocidas como bacilos, las de forma de bastón curvado conocidas como espirilos y las de forma de coma conocidas como vibrios, formas que se muestran detalladamente en la imagen 1-1. (APELLA & ARAUJO: [www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02\\_Capitulo\\_02.pdf](http://www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02_Capitulo_02.pdf)).

**Imagen 1-1:** Morfología de las Bacterias. a- cocos en racimo; b,c- diplococos; d – cocos en cadena; e- cocos en tétradas; f- cocobacilos; g- bacilos; h- bacilos en cadena; i: bacilos aislados y formando ángulos; j,K- espirilos.



Fuente: [https://www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02\\_Capitulo\\_02.pdf](https://www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02_Capitulo_02.pdf).

### 1.2.3.3. Crecimiento microbiano

El crecimiento de una célula es el aumento ordenado de todos sus componentes químicos y por ende de sus estructuras celulares. Para ello las células requieren nutrientes que las ayuden a sintetizar sus biomoléculas y obtener energía, estos nutrientes comúnmente están disueltos en agua, es decir el crecimiento celular depende de la disponibilidad de agua. (APELLA & ARAUJO: [www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02\\_Capitulo\\_02.pdf](http://www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02_Capitulo_02.pdf)).

Para permanecer viables cada especie bacteriana tiene diferentes requerimientos nutricionales y condiciones fisicoquímicas. Así los nutrientes requeridos en grandes cantidades se denominan macronutrientes (C, H, O, N) y aquellos que se necesitan en trazas micronutrientes (Cr, Co, Cu, W, Zn). Ambos tipos requeridos para fines energéticos o biosintéticos, según lo cual, las bacterias se pueden clasificar como lo indica el cuadro 2-1.

**Cuadro 2-1:** Clasificación de las bacterias según sus requerimientos.

Requerimientos	Tipo	Descripción	Ejemplos
Energéticos	Fotótrofas	Utilizan la luz como fuente de energía	Algas y cianobacterias
	Quimiótrofas	Utilizan compuestos químicos como fuente de energía.	Quimiolitótrofas: requieren sustancias inorgánicas sencillas, ej. <i>Nitrobacter</i> Quimiorganótrofas: requieren compuestos orgánicos, ej. <i>Enterpbacter</i> .
Biosintéticos	Autótrofas	Sintetizan sus nutrientes a partir de sustancias orgánicas sencillas.	<i>Clorofitas, cianofitas, Thiobacillus denitrificans.</i>
	Heterótrofas	Su fuente de carbono es orgánica.	<i>Lactobacillus, Serratia.</i>
O <sub>2</sub> (oxígeno)	Aerobias	Necesitan O <sub>2</sub> para crecer	
	Anaerobias facultativas	Pueden realizar respiración aerobia o anaerobia, según el ambiente.	<i>E. coli</i>
	Anaerobias estrictas	El oxígeno les resulta tóxico.	<i>Clostridium</i>
	Anaerobias aerotolerantes	Presentan metabolismo anaerobio (fermentación), pero toleran el oxígeno.	<i>Streptococcus.</i>

Fuente: [https://www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02\\_Capitulo\\_02.pdf](https://www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02_Capitulo_02.pdf).

### Factores fisicoquímicos

Son muchos los factores fisicoquímicos que pueden afectar el crecimiento de las bacterias, entre los principales están:

*Temperatura:* Es uno de los más importantes, temperaturas muy bajas o muy elevadas se usan tanto para la conservación como para provocar la muerte de microorganismos. A temperaturas muy bajas la membrana plasmática y el citoplasma microbiano pierden fluidez disminuyendo el transporte de nutrientes desde el medio. A temperaturas elevadas se inactivan sistemas enzimáticos, desnaturalizan proteínas y se dañan las envolturas celulares, provocando una lisis térmica. Existe una temperatura intermedia que es óptima para el crecimiento bacteriano, es decir, es óptima para que el microorganismo incorpore nutrientes del medio mediante reacciones anabólicas y catabólicas necesarias para el crecimiento y división celular. (APELLA & ARAUJO: [www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02\\_Capitulo\\_02.pdf](http://www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02_Capitulo_02.pdf)).

**Cuadro 3-1:** Clasificación de los microorganismos según la temperatura

Grupo	Temperatura ° C			
	Mínima	Óptima	Máxima	Ejemplos
<b>PSICRÓFILOS</b>				
<b>Obligados</b>	<0	10-15	<20	<i>Flavobacterium</i>
<b>Facultativos</b>	0	15-30	>25	Bacterias deteriorantes de alimentos refrigerados
<b>MESÓFILOS</b>	15-20	30-40	<45	Mayoría de bacterias
<b>TERMÓFILOS</b>				
<b>Facultativos</b>	35	42-45	>50	<i>Thermus aquaticus</i>
<b>Estrictos</b>	45	50-75	>80	<i>Thermoproteus</i>
<b>Extremos</b>	65	80-105	>100	<i>Pyrolobus fumarii</i>

Fuente: [https://www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02\\_Capitulo\\_02.pdf](https://www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02_Capitulo_02.pdf).

*pH:* la concentración de iones hidrogeno también es un factor importante, los ambientes naturales tienen un pH entre 5 y 9, valores entre los que crecen a mayoría de bacterias, pero algunos pueden desarrollarse a valores inferiores o superiores a los indicados. (APELLA & ARAUJO: [www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02\\_Capitulo\\_02.pdf](http://www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02_Capitulo_02.pdf)).

**Cuadro 4-1:** Clasificación de los microorganismos según pH

Tipo de microorganismos	pH	Ejemplo
Acidófilos	1 – 5	<i>Thiobacillus</i>
Neutrófilos	5,5- 8	Mayoría de las bacterias
Basófilos	8,5- 11,5	<i>Bacillus alcalophilus</i>

Fuente: [https://www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02\\_Capitulo\\_02.pdf](https://www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02_Capitulo_02.pdf).

Otros factores son: biodisponibilidad de agua, presión osmótica, disponibilidad de O<sub>2</sub>, tensión superficial y radiaciones.

#### *Recuento de bacterias*

**Cuadro 5-1:** Métodos usados para determinar el crecimiento microbiano

<b>Tipo de células</b>	<b>Método</b>
Vivas y muertas	Recuento en cámara
	Recuento indirecto en portaobjetos
	Contador automático de partículas
	Nefelometría
Vivas	Recuento en medio solido
	Filtración sobre membrana

**Fuente:** [https://www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02\\_Capitulo\\_02.pdf](https://www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02_Capitulo_02.pdf).

#### *1.2.3.4. Medios de cultivo*

En el laboratorio el crecimiento bacteriano se realiza en medios de cultivo, ambientes artificiales que proveen a los microorganismos los nutrientes necesarios para su desarrollo.

Para su uso un medio de cultivo necesita ser esterilizado inmediatamente después de su preparación, así se elimina cualquier tipo de contaminación, este proceso se realiza comúnmente por calor húmedo, a menos que alguno de sus componentes sea termolábiles. Toda la manipulación de estos luego de su esterilización debe ser con la mayor asepsia posible, esto es con materiales estériles y usando una cámara de flujo laminar o cerca de la llama de un mechero. (APELLA & ARAUJO: [www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02\\_Capitulo\\_02.pdf](https://www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02_Capitulo_02.pdf)).

#### *Clasificación*

Según la finalidad de la formulación, los medios de cultivo pueden ser:

*Básicos:* medios que solamente contienen extracto de carne u otra infusión simple, peptona, sal y agua. Por ejemplo: caldo y agar nutritivo, caldo de triptona y soya, caldo o agar de infusión cerebro y corazón, gar y extracto de hígado, dextrosa de Saboraud. (BAILÓN, Lucía., et al. 2003. p.18).

*Enriquecidos:* medios complejos que contienen aditivos que favorecen el crecimiento de determinados microorganismos. Por ejemplo: agar proteosa, agar sangre, agar chocolate, caldo de suero, suero de Loeffler con sangre, medios inclinados de suero, Agar Mueller Hinton. (BAILÓN, Lucía., et al. 2003. p.19).

*Selectivos:* permiten el crecimiento específico de un determinado microorganismo e impiden el crecimiento de los demás, útiles para el aislamiento de cepas bacterianas. Por ejemplo: agarado de lactosa, bilis, taurocolato. (BAILÓN, Lucía., et al. 2003. p.20).

*Diferenciales:* permiten diferenciar a simple vista dos o más tipos de bacterias, según su comportamiento respecto a algún nutriente del medio, comúnmente se trata de un viraje de color de una sustancia indicadora. (APELLA & ARAUJO: [www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02\\_Capitulo\\_02.pdf](http://www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02_Capitulo_02.pdf)).

*Medios de identificación:* aquellos usados para estudiar la acción de un solo tipo de bacterias frente a un sustrato determinado, se siembran con bacterias pertenecientes a un solo clon. Por ejemplo: pruebas bioquímicas. (ÁLVAREZ, María., & BOQUET, Ernesto. 1990. p. 29).

*Medios de multiplicación:* poseen una composición determinada según las bacterias a las que estén destinados, permitirán un máximo crecimiento de las mismas en un tiempo mínimo, usados comúnmente para la preparación de vacunas y antibióticos. (ÁLVAREZ, María., & BOQUET, Ernesto. 1990. p. 29).

*Medios de conservación:* ayudan al mantenimiento de los microorganismos, pueden ser denominados como medios de transporte ya que su finalidad es mantener al microorganismo en estado viable. (ÁLVAREZ, María., & BOQUET, Ernesto. 1990. p. 29).

Según su consistencia los medios de cultivo pueden ser:

*Medios sólidos:* útiles para el crecimiento, aislamiento y obtención de cultivos puros de bacterias y hongos. Los medios de cultivo sólidos se colocan en cajas Petri de vidrio o plástico, aquí las células microbianas se observan en forma de colonias cuantificables. (BAILÓN, Lucía., et al. 2003. p.20).

*Medios semisólidos:* útiles para observar el metabolismo, propagación y obtención de cultivos de bacterias anaeróbicas. (BAILÓN, Lucía., et al. 2003. p.20).

*Medios líquidos (caldos):* útiles para lograr la difusión del microorganismo. Se colocan en tubos tapa rosca o con tapones de algodón, el crecimiento microbiano se observa por enturbiamiento. (BAILÓN, Lucía., et al. 2003. p.20).

### *Principales medios de cultivo*

Entre los medios de cultivo más usados están: Medio de Baird Parker, Agar Cetrimida, Caldo cerebro corazón, Agar Cled (cistina, lactosa, electrolito deficiente), Agar Chapman manitol, Agar chocolate, Agar MacConkey, Agar Sabouraud, Agar sangre, Agar EMB (agar con eosina y azul de metileno), Agar Mueller Hinton, Caldo Triptosa. (ÁLVAREZ, María., & BOQUET, Ernesto. 1990. p. 32).

*Agar EMB (agar con eosina y azul de metileno):* Este agar es un medio de diferenciación, desarrollado por Levine, usado para el cultivo de flora Gram negativa. La lactosa contenida en su composición permite diferenciar a los microorganismos fermentadores de azúcar, la eosina y el azul de metileno (colorantes) inhiben la mayor parte de bacterias gram positivas (excepto *Streptococcus faecalis*). Además de ello en este medio las colonias de *Escherichia coli*, se observan con un brillo verde metálico a luz reflejada. Su composición en g/L de agua destilada es: 10g de peptona, 10g de lactosa, 2g de fosfato dipotásico, 0,4 g de Eosina, 0,2065g de azul de metileno, 15g de agar y un pH de 6,8. (ÁLVAREZ, María., & BOQUET, Ernesto. 1990. p. 32).

*Agar Mueller Hinton:* Este agar es un medio enriquecido, usado como medio de elección para antibiogramas, debido a que favorece el crecimiento de todo tipo de células bacterianas. Su composición en g/L de agua destilada es: 300g de infusión de carne, 17,5g de hidrolizado de caseína, 1,5g de almidón, 17g de agar y un pH de 7,4. (ÁLVAREZ, María., & BOQUET, Ernesto. 1990. p. 34).

### *Técnicas de inoculación*

Las bacterias se cultivan en materiales estériles, de preferencia de vidrio, como tubos de ensayo, cajas Petri, Erlenmeyer y tubos de fermentación.

Para sembrar un cultivo bacteriano en un medio estéril, un cierto número de células (inoculo) se transfieren o inoculan al medio tomando precauciones que aseguren la pureza del cultivo. Este procedimiento se puede hacer con un hisopo estéril, un asa de cultivo o una aguja de siembra, las dos últimas antes y después de la siembra deben calentarse en una llama al rojo vivo para destruir cualquier forma de vida que pueda encontrarse sobre su superficie. (BAILÓN, Lucía., et al. 2003. p.20).

Luego de la inoculación el cultivo bacteriano debe incubarse, según los requerimientos de las cepas bacterianas, para lograr un desarrollo de las células, las cuales llegan a ser visibles como un enturbiamiento en un medio líquido, o como una colonia en un medio sólido, en donde se pueden diferenciar especies. (BAILÓN, Lucía., et al. 2003. p.20).

### *Inoculación en medios sólidos*

- Placas Petri

*En estría:* cruzada, en Z, simple o Masiva. En esta siembra el inóculo se disemina de atrás para adelante, con el propósito de agotar el inóculo hasta obtener colonias aisladas.

*Por vaciado en placa:* proporciona por lo general placas con un número apropiado de colonias, se basa en una dilución aproximadamente cuantitativa de la muestra original en un medio sólido. (BAILÓN, Lucía., et al. 2003. p.20).

- Tubos pico de flauta o cola de pescado

Puede hacerse por picadura, esto es en plano inclinado, atravesando todo el fondo del agar con el asa recta; por estría, o por picadura y estría a la vez. (BAILÓN, Lucía., et al. 2003. p.20).

### *Inoculación en medios semisólidos*

Por picadura: se realiza en tubos con agar inclinado que constituye un medio adecuado para el desarrollo de bacterias con características como la formación de pigmentos, que se observan más fácilmente sobre estos medios. La prueba que se valora comúnmente es la motilidad, para lo cual solo se pica el agar con la aguja, con un movimiento recto. (BAILÓN, Lucía., et al. 2003. p.20).

### *Inoculación en medios líquidos*

Es estos medios el crecimiento bacteriano se observa como un enturbiamiento, un velo o sedimento. (BAILÓN, Lucía., et al. 2003. p.20).

#### *1.2.3.5. Placas petrifilm*

La siembra en placas petrifilm es un método reconocido por la AOAC Internacional (Asociación of Official Analytical Chemist), como método Oficial de Análisis (OMA), consisten en medios de cultivo listos para sembrar, los cuales contienen adhesivos, películas y nutrientes que permiten llevar a cabo

las pruebas microbiológicas de forma rápida y reproducible. Tienen como objeto aumentar la productividad, dar consistencia y ofrecer costes más bajos en comparación con los métodos convencionales. (3M, Petrifilm, 2014. p.3).

El análisis microbiológico se realiza en tres simples pasos:

1. Sembrar: levantar la película y añadir la muestra.
2. Incubar: gracias a su diseño se ahorra espacio en la estufa
3. Contar: por los pigmentos indicadores la placa puede leerse en pocos minutos. (3M, Petrifilm, 2004. p.3).

### *Fundamento*

*Placas Petrifilm E. coli/ coliformes:* la prueba reúne dos ensayos en uno, contiene nutrientes de Bilis y Rojo Violeta, un agente gelificante soluble en agua fría, un indicador de la actividad de glucoronidasa, y un indicador que facilita el conteo de colonias. La mayoría de las *E.coli* producen  $\beta$ - glucoronidasa que origina un precipitado azul, el film superior atrapa el gas producido por los coliformes. Aproximadamente el 95% de *E. coli* producen gas, indicado por las colonias de color rojo a azulado asociadas con el gas atrapado sobre la placa. (3M, Petrifilm, 1998. p.2).

*Placas Petrifilm Recuento de Aerobios:* este medio de cultivo contiene nutrientes del agar Standars Methods, un agente gelificante soluble en agua fría, y un tinte indicador de color rojo que facilita el recuento de las colonias. (3M, Petrifilm, 2004. p.2).

*Placas Petrifilm Recuento Staph Express:* contiene un sistema de medio de cultivo preparado cromogénico de Baird – Parker modificado que es selectivo y diferencial para *Staphylococcus aureus*, los cuales aparecen como colonias rojo- violeta en la placa. (3M, Petrifilm, 2004. p.6).

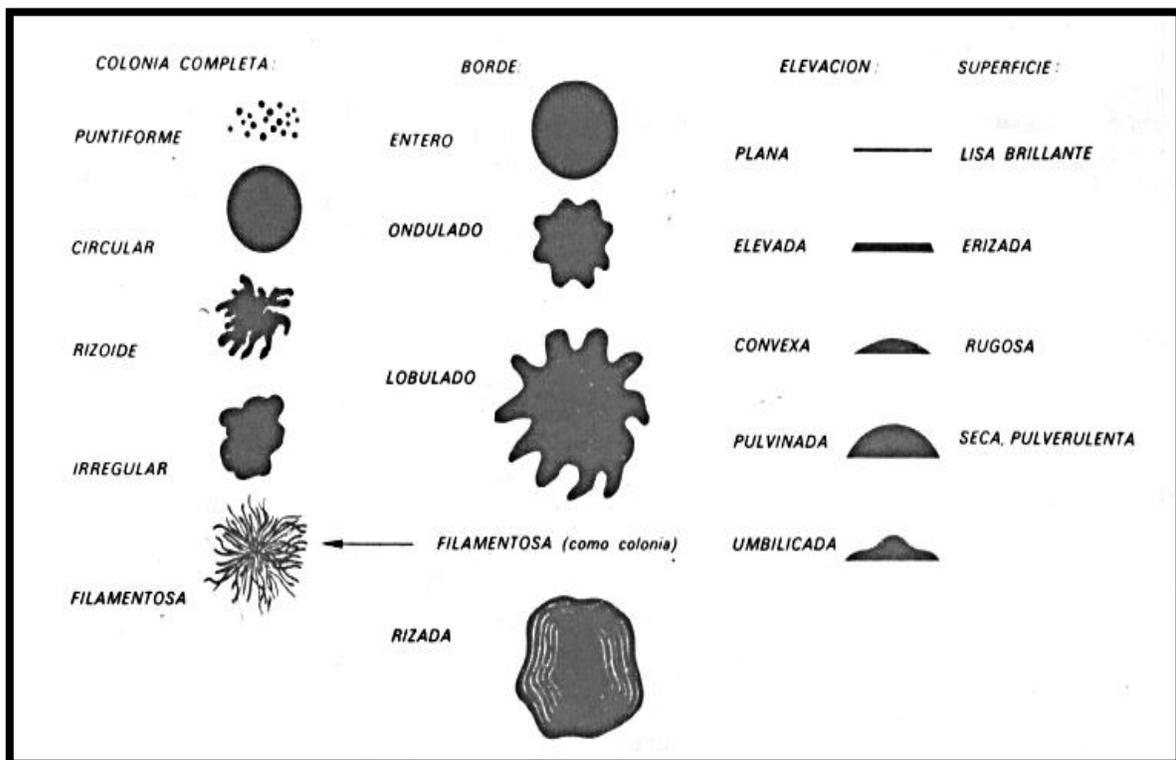
*Placas Petrifilm Mohos y Levaduras:* contiene nutrientes de Sabhi, dos antibióticos (clorotetraciclina y cloranfenicol), indicador de fosfatos (BCIP) un agente gelificante soluble en agua fría y un tinte indicador que facilita el recuento. Las levaduras aparecen normalmente como colonias pequeñas verde azuladas con bordes definidos y generalmente sin un punto negro en su centro. Los mohos suelen mostrarse como colonias grandes de color variable, con bordes difusos y foco central. (3M, Petrifilm, 2004. p.8).

### 1.2.3.6. Observación bacteriana

#### Crecimiento en medio sólido

Comúnmente las células bacterianas se reproducen en un tiempo de 24-48 horas, dando lugar a masas visibles denominadas colonias, que están formadas por un solo tipo de microorganismos. Las colonias poseen una morfología característica que puede ser observada a simple vista o con ayuda de una lupa, siendo los parámetros más observados la forma, el tamaño, la elevación, el borde, la superficie y el color, aspectos observados en la imagen 2-1. (APELLA & ARAUJO: [www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02\\_Capitulo\\_02.pdf](http://www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02_Capitulo_02.pdf)).

**Imagen 2-1:** Caracteres observables más importantes de una colonia en medio sólido



Fuente: [http://www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02\\_Capitulo\\_02.pdf](http://www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02_Capitulo_02.pdf).

#### Crecimiento en medio líquido

En este caso los aspectos más importantes son la cantidad de crecimiento, el crecimiento en la superficie, la turbidez, el aspecto del depósito en el fondo del tubo. (APELLA & ARAUJO: [www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02\\_Capitulo\\_02.pdf](http://www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02_Capitulo_02.pdf)).

### *1.2.3.7. Diferenciación Bacteriana*

En la diferenciación bacteriana se siguen algunos criterios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos, patogénicos e inmunológicos que ayudan a la discriminación y caracterización de microorganismos. Existen características fácilmente apreciables como son las que responden a la coloración Gram, la morfología bacteriana y el tipo de respiración. (APELLA & ARAUJO: [www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02\\_Capitulo\\_02.pdf](http://www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02_Capitulo_02.pdf)).

#### *Tinción Gram*

Esta técnica fue desarrollada por el bacteriólogo danés Christian Gram, consiste en una tinción importante como medio primario de clasificación morfológico, que permite separar a las bacterias en dos grupos: Gram positivas y Gram negativas, esto basado en si luego de la decoloración retienen o no el colorante primario llamado cristal violeta. Las bacterias que retienen este colorante aparecen como azul oscuro o violeta y corresponden a las Gram positivas, mientras que aquellas que pierden el cristal violeta y se tiñen del colorante secundario llamado safranina aparecen como rojas y corresponden a las Gram negativas. (VIZCARRODO. Milagros., & GUTIÉRREZ. Sofía. 2008. p.2).

Las bacterias Gram positivas y Gram negativas se tiñen de forma distinta debido a diferencias en su estructura celular. La pared de la célula Gram positiva es gruesa y consistente debido a que está formada por ácido teitónico y por varias capas de peptidoglicano, el material que le confiere rigidez a la misma. La pared de la célula Gram negativa contiene una capa mucho más delgada, solo de peptidoglicano y está rodeada por una membrana exterior compuesta de fosfolípidos, lipopolisacáridos y lipoproteínas. La diferenciación de las bacterias de interés clínico en base a esta técnica se detalla en el cuadro 6-1. (SANTAMBROSIO, Esteban., et col. 2009. p.8).

**Cuadro 6-1:** Diferenciación de bacterias de interés clínico en base a la coloración Gram y respiración

Coloración Gram	Morfología	Respiración			
		Aerobia	Anaerobia	Microaerofilo	Anaerobia facultativa
Negativa	Cocacea (esferas)	<i>Moraxella</i> , <i>Neisseria</i>	<i>Veillonella</i>		
	Bacilar (bastones)	<i>Acinetobacter</i> , <i>Alcaligenes</i> , <i>Bordetella</i> ; <i>Brucella</i> , <i>Flacobacterium</i> , <i>Francisella</i> , <i>Legionella</i> , <i>Moraxella</i> ; <i>Pseudomonas</i> .	<i>Bacteriodes</i> , <i>Fusobacterium</i> .	<i>Campylobacter</i>	<i>Actinobacillus</i> , <i>Aeromonas</i> , <i>Chromobacterium</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>gardnerella</i> , <i>Haemophilus</i> , <i>Kingella</i> , <i>Pasteurella</i> , <i>Plesiomonas</i> , <i>Vibrio</i>
Positiva	Cocacea (esferas)	<i>Micrococcus</i>	<i>Peptococcus</i> , <i>Peptostreptococcus</i> .	<i>Aerococcus</i>	<i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Gemella</i> .
	Bacilar (bastones)	<i>Bacillus</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Streptomyces</i> .	<i>Actinomyces</i> , <i>Arachnia</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Eubacterium</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Propionibacterium</i>		<i>Corynebacterium</i> , <i>Erysipelothrix</i> , <i>Listeria</i> .

Fuente: [https://www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02\\_Capitulo\\_02.pdf](https://www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02_Capitulo_02.pdf).

## *Pruebas Bioquímicas de Identificación*

Las pruebas bioquímicas permiten determinar las características metabólicas de las bacterias, algunas son rápidas y evalúan la presencia de una enzima, su lectura va desde segundos hasta unas pocas horas, pero la mayoría requieren un poco más de tiempo, pues necesitan incubar al microorganismo durante unas 24 a 48h o más, esto para detectar componentes metabólicos o sensibilidad a alguna sustancia. (FERNÁNDEZ, Ana., et al. 2010. p. 6)

- *Pruebas con lectura inmediata*

*Catalasa:* la catalasa es una enzima que se encuentra presente en casi todos los microorganismos que poseen citocromos, estas bacterias hidrolizan el peróxido de hidrogeno en agua y oxigeno gaseoso liberado en forma de burbujas. (FERNÁNDEZ, Ana., et al. 2010. p. 6)

*Oxidasa:* esta prueba detecta la presencia de enzimas oxidasas, esta reacción se produce debido a la presencia de un sistema citocromo oxidasa que activa la oxidación del citocromo, el cual se reduce por acción del oxígeno molecular dando como resultado agua o peróxido de hidrogeno, dependiendo de la especie bacteriana. Generalmente el sistema citocromo oxidasa se encuentra solo en bacterias aerobias y algunas anaerobias facultativas, las anaerobias estrictas no lo poseen. La presencia de oxidasa va ligada a la producción de catalasa, ya que esta degrada el peróxido de hidrogeno producido por la reducción del oxígeno. (FERNÁNDEZ, Ana., et al. 2010. p. 6)

- *Pruebas con lectura lenta*

*Hidrolisis de almidón:* determina la capacidad de ciertas bacterias para hidrolizar esta sustancia, utilizando un medio de cultivo con almidón soluble y como reactivo una solución de yodo, la aparición de una zona incolora indica hidrolisis de almidón. (ÁLVAREZ, María., & BOQUET, Ernesto. 1990. p. 125).

*Hidrolisis de gelatina:* determina la capacidad de ciertos microorganismos de hidrolizar gelatina a péptidos y aminoácidos, por acción de enzimas específicas denominadas gelatinasas. (ÁLVAREZ, María., & BOQUET, Ernesto. 1990. p. 125).

*Agar hierro Kligler:* mediante esta prueba se puede determinar la capacidad de un microorganismo para metabolizar un hidrato de carbono específico (glucosa, lactosa), la producción de gases CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>

como productos finales del metabolismo de hidratos de carbono y la producción de ácido sulfhídrico. (ÁLVAREZ, María., & BOQUET, Ernesto. 1990. p. 115).

*Prueba SIM (Sulfuro- Indol- Movilidad):* determina la presencia en bacterias de la enzima triptofanasa, la cual degrada el aminoácido triptófano a indol, manifestado por la aparición de un anillo rojizo debido a que el reactivo de Kovacks reacciona con el indol. A partir del tiosulfato de sodio los microorganismos pueden generar ácido Sulfhídrico y debido al agar se puede detectar la movilidad. (ÁLVAREZ, María., & BOQUET, Ernesto. 1990. p. 115).

*Prueba del Citrato:* esta prueba determina la capacidad que poseen algunos microorganismos de utilizar al citrato como única fuente de carbono, produciendo alcalinidad. El medio usado para esta prueba es el Agar Simmons Citrato. (ÁLVAREZ, María., & BOQUET, Ernesto. 1990. p. 115).

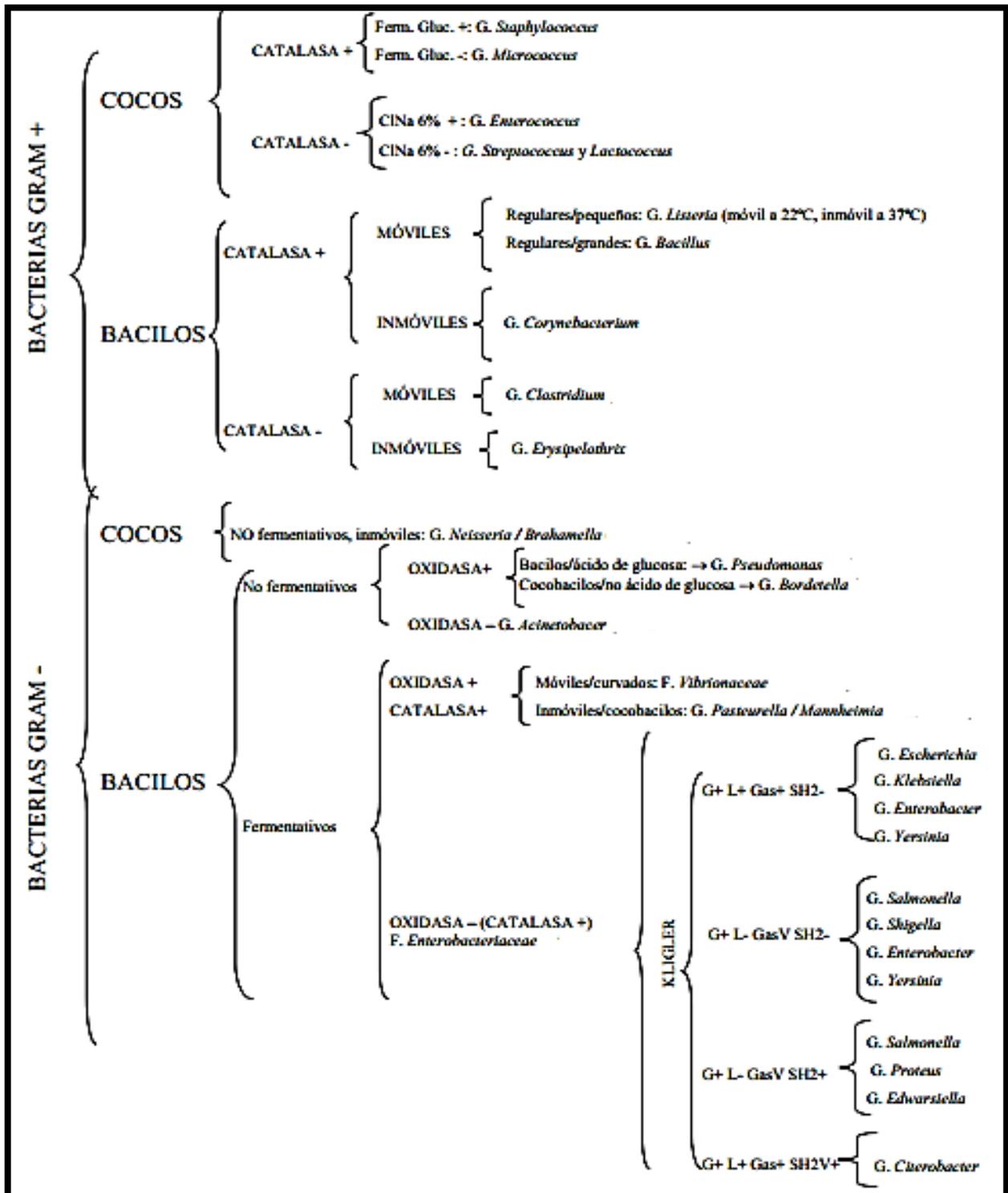
*Prueba de la Urea:* determina si un microorganismo tiene la capacidad de desdoblar urea mediante un proceso de alcalinización producida en el medio de cultivo y detectada mediante un indicador de pH que en este caso es el rojo fenol. (ÁLVAREZ, María., & BOQUET, Ernesto. 1990. p. 115).

*Oxido fermentación:* con esta prueba se determina si los microorganismos utilizan los hidratos de carbono por vía oxidativa (proceso aeróbico, presencia de oxígeno) o por vía fermentativa (proceso anaeróbico, ausencia de oxígeno). (FERNÁNDEZ, Ana., et al. 2010. p. 7)

*Fermentación de azúcares:* a menudo las bacterias anaerobias y las aerobias facultativas fermentan carbohidratos transformándolos en ácidos orgánicos y gas, que pueden detectarse con la ayuda de un indicador de pH. (FERNÁNDEZ, Ana., et al. 2010. p. 7)

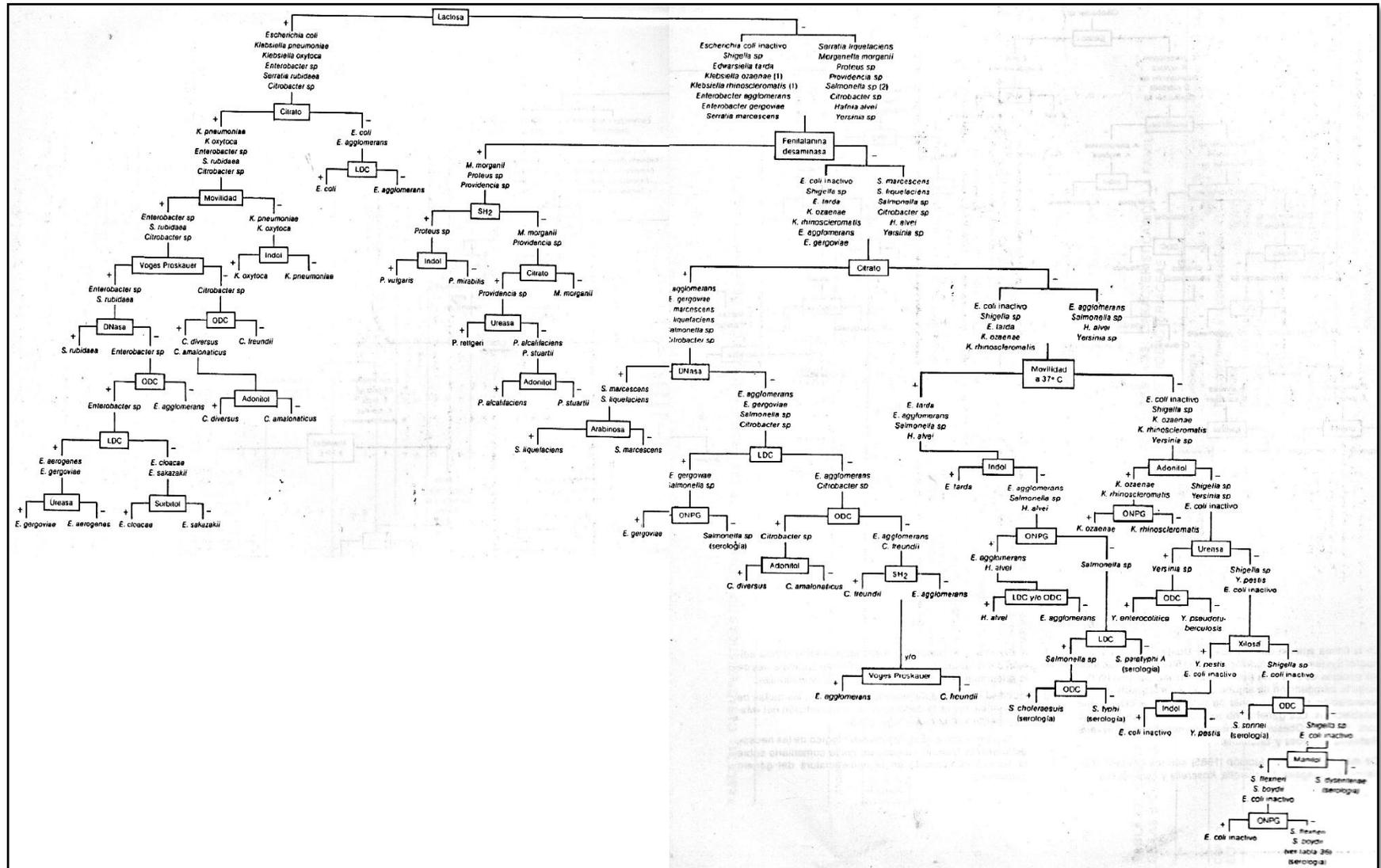
Otras pruebas muy comunes son: Reducción de nitratos, Rojo de metilo, Fenilalanina- desaminasa, Descarboxilisas, Prueba de CAMP, Prueba de la Coagulasa, Prueba de ADNasa, Hidrólisis de la Esculina, Prueba de la Niacina. (FERNÁNDEZ, Ana., et al. 2010. p. 7)

Imagen 3-1: Esquema de la identificación de los microorganismos más usados en laboratorio



Fuente: [https://www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02\\_Capitulo\\_02.pdf](https://www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02_Capitulo_02.pdf).

Imagen 4-1: Clave diferencial de las especies de a familia *Enterobacteriaceae*



Fuente: ÁLVAREZ, María., & BOQUET, Ernesto. 1990.

#### 1.2.3.8. *Sistemas de Identificación Bioquímica Microgen*

Los sistemas de identificación Bioquímica Microgen consisten en tiras de micropocillos de microtitulación que contienen doce sustratos deshidratados, seleccionados mediante un análisis informático de sustratos existentes para la identificación de los organismos objetivo. Estos sustratos se basan en métodos tradicionales, son fáciles de inocular y utilizan un software completo para la interpretación de resultados. (MICROGEN: [www.microgenbioproducts.com/bacteriology.htm](http://www.microgenbioproducts.com/bacteriology.htm)).

Los Sistemas Microgen existentes son:

- Microgen GN- ID™
- Microgen Listeria™-ID
- Microgen Bacillos™-ID
- Microgen™ Staph –ID
- Microgen™ Strep –ID

#### *Sistema Microgen GN- ID™*

Este sistema es el encargado de la identificación de bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* y otros bacilos no exigentes Gram negativos (oxidasa negativos y positivos). Comprende dos tiras de micropocillos (GN A y GN B), cada una de ellas con 12 sustratos bioquímicos estandarizados, los cuales una vez metabolizados darán resultados que pueden ser interpretados usando el software Microgen Identificación (MID- 60), mismo que identificara el organismo aislado. (MICROGEN: <http://www.medica-tec.com/arg/files/MICROGEN-GN-ID-MID65%20y%20MID641.pdf>).

#### 1.2.3.8. *Microorganismos presentes en aguas naturales*

En el agua pueden estar presentes una variedad de microorganismos, dentro de los cuales están algunas células eucariotas (algas, protozoarios y hongos), células procariotas (bacterias) y hasta ciertos tipos de virus. (APELLA & ARAUJO: [www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02\\_Capitulo\\_02.pdf](http://www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02_Capitulo_02.pdf)).

## *Bacterias*

De toda la cantidad de microorganismos presentes en el agua, los de mayor interés son las bacterias, ya que más del 80% de las mismas pueden diferenciarse usando como medio la tinción Gram. (APELLA & ARAUJO: [www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02\\_Capitulo\\_02.pdf](http://www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02_Capitulo_02.pdf)).

### *Bacterias Gram negativas*

Entre las principales se pueden mencionar las pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Gallionella*, *Enterobacteriaceae*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*; *bordetella*, *Neisseria*, *Moraxella* y *Acinetobacter*. (APELLA & ARAUJO: [www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02\\_Capitulo\\_02.pdf](http://www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02_Capitulo_02.pdf)).

*Pseudomonas*: son las más comunes por su versatilidad respecto a fuentes de carbono y a sus bajos requerimientos nutricionales. Son bacilos psicrófilos con flagelos, producen pigmentos de color verde, azul verdoso, rojo, marrón y no forman esporas. Se diferencian de las *E. coli* porque no fermentan azúcares. Según el Manual de Bergey de las siete especies, la *Pseudomonas aeruginosa* es la de mayor interés sanitario, causante de infecciones urinarias. Es resistente al cloro, por lo que es usada como un indicador de la eficiencia de la cloración. (APELLA & ARAUJO: [www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02\\_Capitulo\\_02.pdf](http://www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02_Capitulo_02.pdf)).

*Enterobacteriaceae* o enterobacterias: son las más importantes dentro de las bacterias anaerobias facultativas, su presencia está ligada a contaminación fecal. Este tipo de bacterias habitan comúnmente en el intestino de animales, son bacilos no esporulados, inmóviles, con requerimientos nutricionales simples. Se identifican por su capacidad para fermentar glucosa. De ellas la *Escherichia coli*, habitante normal del intestino humano, es usada como indicador de contaminación fecal y es causante de infecciones intestinales. En este grupo también están la *Shigella dysenterae* causante de disentería, *Salmonella typhimurium* y *typhi*, causantes de gastroenteritis y fiebre tifoidea respectivamente. (APELLA & ARAUJO: [www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02\\_Capitulo\\_02.pdf](http://www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02_Capitulo_02.pdf)).

*Neisseria*: son cocos aislados de sedimentos acuíferos aeróbicos, de ellos las más importantes son la *Neisseria gonorrhoeae* causantes de gonorrea y la *Neisseria meningitidis* causante de meningitis. (APELLA & ARAUJO: [www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02\\_Capitulo\\_02.pdf](http://www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02_Capitulo_02.pdf)).

*Moraxella* y *Acinetobacter*: son bacterias del tipo bacilos, pero se transforman en cocos y por ello son considerados como bacilocos. (APELLA & ARAUJO: [www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02\\_Capitulo\\_02.pdf](http://www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02_Capitulo_02.pdf)).

### *Bacterias Gram positivas*

Se trata de un grupo de bacterias no muy común en el agua, incluye algunos patógenos aislados de aguas subterráneas. Los más comunes son los del genero *Micrococcus*, *Staphylococcus* y *Streptococcus*. (APELLA & ARAUJO: [www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02\\_Capitulo\\_02.pdf](http://www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02_Capitulo_02.pdf)).

*Micrococos* y *estafilococos*: bacterias aerobias tolerantes en concentraciones salinas elevadas, que los diferencia de los estreptococos. Se trata de importantes patógenos humanos y se consideran procedentes de aguas subterráneas. (APELLA & ARAUJO: [www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02\\_Capitulo\\_02.pdf](http://www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02_Capitulo_02.pdf)).

*Estreptococos*: incluye a *Enterococcus faecalis*, patógeno humano que habita comúnmente en el intestino de hombres y animales, por lo que se lo considera un indicador de contaminación fecal. (APELLA & ARAUJO: [www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02\\_Capitulo\\_02.pdf](http://www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02_Capitulo_02.pdf)).

*Bacillus* y *Clostridium*: son bacterias esporulantes, presentan metabolismo aeróbico y anaeróbico respectivamente, de ellas las especies patógenas son las que producen exotoxinas, la del *Bacillus anthracis*, permite el desarrollo de ántrax y la del *Clostridium tetani* causante del tétano. (APELLA & ARAUJO: [www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02\\_Capitulo\\_02.pdf](http://www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02_Capitulo_02.pdf)).

### *Bacterias indicadoras de Contaminación*

Desde el punto de vista sanitario las condiciones bacteriológicas del agua son muy importantes, según las normas de calidad, el agua debe estar libre de patógenos de origen entérico y parasitario, pues estos son los responsables de la transmisión de enfermedades.

Para ser considerados microorganismos indicadores de contaminación deben ser fáciles de aislar y crecer en el laboratorio, su presencia en el agua debe estar relacionada con la de otros microorganismos más difíciles de aislar; dentro de ellas están:

*Aerobias mesófilas*: Determinan efectividad del tratamiento de aguas, debido a la gran sensibilidad que estas poseen a los agentes de cloración. (APELLA & ARAUJO: [www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02\\_Capitulo\\_02.pdf](http://www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02_Capitulo_02.pdf)).

*Coliformes*: Habitan usualmente en los intestinos de mamíferos y aves, se caracterizan por pertenecer a la familia de las Enterobacteriaceae, son bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos, no esporulantes, fermentadores de lactosa con producción de gas, capaces de desarrollarse a 35°C. (ARCOS, Mireya., et al. 2005. p. 72). Dentro de estas se encuentran los géneros: *Escherichia* (origen fecal), *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter* y *Edwardsiella* (saprofitas independientes). Clasificándose así en coliformes totales, grupo que incluye a las coliformes de cualquier origen; y en coliformes fecales, a las que habitan en intestinos animales y tienen capacidad de fermentar lactosa. (APELLA & ARAUJO: [www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02\\_Capitulo\\_02.pdf](http://www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02_Capitulo_02.pdf)).

Las Coliformes fecales pueden considerarse termotolerantes, pues soportan temperaturas más elevadas 44.5°C, característica que las diferencian de las coliformes totales, además de ello su capacidad de reproducción fuera del intestino es favorecida por condiciones adecuadas de materia orgánica, pH, humedad, etc. Estas bacterias son de interés clínico por tener la capacidad de producir infecciones de piel y tejidos blandos, diarreas y otras enfermedades severas. (ARCOS, Mireya., et al. 2005. p. 72).

**Cuadro 7-1:** Características generales de *Escherichia coli*

<b>Morfología y tinción</b>	Bacilos Gram (-)
<b>Movilidad</b>	(+)
<b>Respiración</b>	Aerobios -Anaerobios facultativos
<b>Requerimientos nutricionales</b>	No exigentes
<b>Medio OF</b>	Fermentadores
<b>Catalasa</b>	(+)
<b>Oxidasa</b>	(-)
<b>Glucosa</b>	(+)
<b>Lactosa</b>	(+)
<b>Citrato</b>	(-)
<b>Ureasa</b>	(-)
<b>H2S</b>	(-)
<b>Indol</b>	(+)

Realizado por: Evelyn Ocaña

Fuente: ACUÑA, Ana., et al. 2002. p.50.

### *Pseudomonas*

Las *Pseudomonas* son bacilos Gram negativos no esporulados, presentan flagelos polares que pueden producir un pigmento fluorescente, son oxidasa positivas, utilizan la glucosa oxidativamente, indican

deterioro en la calidad del agua y no producen gas. Son comunes en el suelo y agua, y de ellos las especies más importantes son: *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. maltophila* y *P. stutzeri*. (ARCOS, Mireya., et al. 2005. p. 74).

La *Pseudomonas aeruginosa* es un patógeno oportunista que no necesita requerimientos nutricionales exigentes y puede sobrevivir durante mucho tiempo en medio acuoso a temperatura ambiente. No es una bacteria común del agua ya que puede proceder de heces humanas y animales, es decir de encontrarse presente en la misma se asocia con contaminación por aguas residuales, y por lo mismo causante de infecciones de oído, ojos y piel, por lo que su control en aguas usadas para turismo y recreación es obligatorio en muchos lugares del mundo. (ARCOS, Mireya., et al. 2005. p. 74).

*Cedecea*: Este género, inicialmente denominado como grupo entérico 15, pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y actualmente tiene identificado seis de sus especies *C. divisae*, *C. neteri*, *C. lapagei*, *C. especie 3*, *C. especie 5* y *C. especie 6*. Se trata de bacilos Gram negativos, no fermentadores de lactosa, oxidasa negativos, catalasa positivos, anaerobios facultativos, no esporulados, sin motilidad y reductores de nitratos, son lipasa positivos, muy parecidos a la *Serratia* spp., excepto en la falta de desoxirribonucleasa y la actividad gelatinasa. (SALAZAR, Grace., et al. 2012. p.87).

Son bacterias patógenas no frecuentes, oportunistas y con significado clínico no muy determinado, se encuentran en las vías respiratorias superiores (asociados a neumonía), en infecciones de tejidos blandos como úlceras, abscesos y heridas, además en infecciones oftálmicas y bacterianas. (SALAZAR, Grace., et al. 2012. p.87). Excepto la *Cedecea* especie 5 que se ha encontrado comúnmente en heridas de los pies. (KONEMAN, Elmer. 2006. p.264)

**Cuadro 8-1:** Características generales del Género *Cedecea* y *Cedecea especie 5*.

Pruebas Bioquímicas	Género <i>Cedecea</i>	<i>Cedecea</i> especie 5
<b>Catalasa</b>	(+)	(+)
<b>Oxidasa</b>	(-)	(-)
<b>Glucosa</b>	(-)	(-)
<b>Lactosa</b>	(+)	(+)
<b>Citrato</b>	(-)	(+)
<b>Ureasa</b>	(-)	(-)
<b>H<sub>2</sub>S</b>	(-)	(-)
<b>Indol</b>	(-)	(-)
<b>Lisina</b>	(-)	(-)
<b>Ornitina</b>	(-)	(-)
<b>Arabinosa</b>	(-)	(-)
<b>Malonato</b>		(-)

Realizado por: Evelyn Ocaña

Fuente: SALAZAR, Grace., et al. 2012. p.88

*Vibrio*: Los microorganismos de este género son bacilos Gram negativos, aerobios y anaerobios facultativos, catalasa y oxidasa positivos, fermentan glucosa y generalmente son halodependientes, es decir requieren la presencia de cloruro de sodio para su crecimiento. Son comunes de hábitats marinos, en aguas de temperatura de entre 17-20°C, por ello son más comunes en países templados. (GUTIEÉRREZ & GARCÍA: <http://www.revistaaquatic.com/aquatic/art.asp?c=22>).

De todas las especies aisladas 12 se consideran patógenas, entre ellas están: *V. alginolyticus*, *V. carchariae*, *V. cholerae*, *V. fluvialis*, *V. furnisii*, entre otras. De estas la más conocida es la *V. cholerae* por su peculiar epidemiología y su gran patología. . (GUTIEÉRREZ & GARCÍA: <http://www.revistaaquatic.com/aquatic/art.asp?c=22>)

**Cuadro 9-1:** Características generales del Género *Vibrio*

Prueba bioquímica	Resultado
Movilidad	+
Oxidasa	+
Arginina	-
Lisina	+
Gas glucosa	-

Realizado por: Evelyn Ocaña

Fuente: BARROW, G., & FELTHAM, R. 1993. p. 123.

*Vibrio alginolyticus* es uno de los microorganismo que pertenece a este género, es el más halofílico de todos, normalmente se aísla de aguas costeras, saladas y de alimentos de origen marino o contaminados con agua de mar. En cuanto a su virulencia se ha estudiado su capacidad de producir hemólisis, hemaglutinación y la presencia de proteasas. (ZAVALA, Ariana. 2005. p.5).

*Bacillus*: Los microorganismos de este género son bacilos Gram positivos, de gran tamaño, aerobios estrictos o anaerobios facultativos, catalasa positivos, forman esporas muy resistentes y normalmente son móviles. Dentro de *Bacillus* spp. tenemos a: *B. polymyxa*, *B. subtilis*, *B. brevis* y *B. anthracis*. (CUERVO, Jenny. 2010. p.7).

La mayoría de las especies de *Bacillus* son inocuas, pero por ejemplo *B. cereus* causa intoxicación alimentaria, otras sepa en cambio elaboran una toxina estable a altas temperaturas en alimentos generando vómitos y otras producen una enterotoxina causante de diarreas, es decir comunemente se asocian al consumo de diversos alimentos. (BVSDE: [http://www.bvsde.paho.org/cd-gdwq/docs\\_microbiologicos/Bacterias%20PDF/Bacillus.pdf](http://www.bvsde.paho.org/cd-gdwq/docs_microbiologicos/Bacterias%20PDF/Bacillus.pdf)).

*Bacillus* spp. también se detecta comúnmente en agua, incluso en aquella que han sido tratada previo consumo, esto debido a sus esporas altamente resistentes a procesos de desinfección. (BVSDE: [http://www.bvsde.paho.org/cd-gdwq/docs\\_microbiologicos/Bacterias%20PDF/Bacillus.pdf](http://www.bvsde.paho.org/cd-gdwq/docs_microbiologicos/Bacterias%20PDF/Bacillus.pdf))

### **1.3. Aguas Termales, Termomedicinales o Termominerales**

#### **1.3.1. Definición**

El agua termal está definida como aquella agua subterránea que en su punto de emergencia posee una temperatura 4-5 °C mayor que la temperatura media anual del ambiente que las rodea. El agua mineral por su parte se define como el agua no contaminada, que emerge del suelo y que gracias a sus propiedades físico-químicas, composición química y microbiología tiene aplicaciones dietéticas y puede producir acciones fisiológicas en el organismo humano. (BURBANO, Napoleón., et al. 2013. p.7).

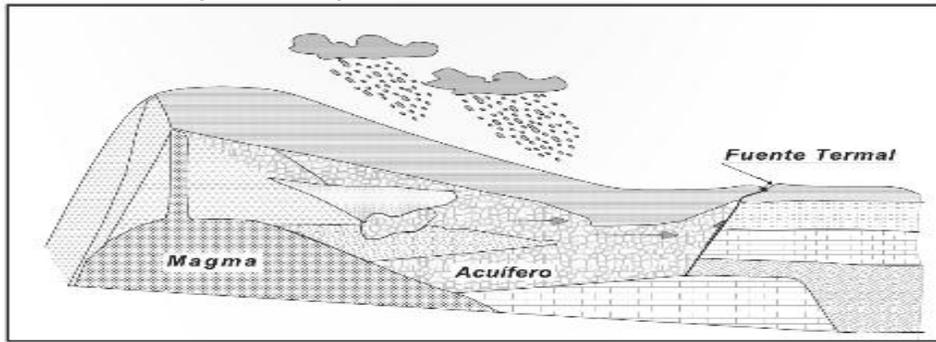
En términos de Hidrología Medica se entiende por aguas mineromedicinales a aquellas que por sus características especiales como su contenido mineral y temperatura proporcionan efectos terapéuticos y son de utilidad pública, destacando que poseen un dinamismo físico-químico y un equilibrio químico biológico que desaparece a medida que se aleja de su origen, por ello para que la terapia termal funcione adecuadamente debe realizarse a pie de manantial. (TERMARED: [http://www.termared.com/docs/repositorio//es\\_ES//investigacion/aguas-mineromedicinales.pdf](http://www.termared.com/docs/repositorio//es_ES//investigacion/aguas-mineromedicinales.pdf)).

#### **1.3.2. Origen**

En la tierra existen zonas altamente fisuradas con un efecto termodinámico que hace que el agua que circula por las mismas tenga una temperatura elevada, más aun cuando se trata de zonas volcánicas debido al calor que el magma transfiere a las rocas, imagen 5-1. Es por ello que cuando estas aguas emergen a la superficie lo hacen a temperaturas superiores a las del ambiente, convirtiéndose así en fuentes termales. (BURBANO, Napoleón., et al. 2013. p.7).

Además al entrar en contacto con las rocas el agua adquiere su composición química, lo hace mediante un proceso complejo en el que intervienen factores de tipo químico- físico, geológico, hidrológico, climático y otros que le dan las características de aguas minerales. (BURBANO, Napoleón., et al. 2013. p.7).

**Imagen 5-1:** Origen de las aguas termominerales.



Fuente: BURBANO, Napoleón., et al. 2013. p.7

### 1.3.3. Características

*Temperatura:* La temperatura de un agua para que sea considerada termal debe ser mayor por 4 o 5°C a la media anual del ambiente en el que se encuentran, esto fue decretado en 1973 por la Ley de Minas. Fundamentalmente depende de la profundidad de su origen, es decir aumenta con la profundidad, hablando así de un gradiente geotérmico de 3°C por cada 100 metros. Además hay que recalcar que este parámetro no siempre es constante ya que los fenómenos del subsuelo pueden ocasionar que las aguas sean homotérmicas (temperatura constante) o heterotérmicas (variaciones estacionales). (RODÉS, Benito. 2000. p.72 ).

*pH:* En el agua pura, el valor de este parámetro sería 7 debido a su neutralidad, pero en las aguas mineromedicinales termales por la presencia de sustancias ionizadas y su temperatura elevada, se modifica, pudiendo ser más ácido cuando se trata de aguas de origen volcánico (Llamas del Agua, 2009) o aguas calcáreas, y ser más básico cuando provienen de terrenos pobres en calizas o silicatos inferiores. (MOURELLE, María. 2007. p.10).

*Conductividad:* Los valores de este parámetro van en aumento con la temperatura y dependen del soluto, es decir para concentraciones bajas la conductividad térmica disminuye. (MOURELLE, María. 2007. p.10).

*Composición Química:* Esta es variable, pues depende tanto del origen de las aguas, como de las capas rocosas que haya atravesado. Los procesos físico- químicos y termodinámicos que condicionan la disolución de los minerales, tienen un papel importante en la forma en que las aguas adquieren e incorporan en forma iónica los elementos que las componen, siendo así que al tener un origen

endógeno puede poseer elementos como cloruros, bromo, yodo, sulfato y sulfuro de hidrogeno, entre otros. (BURBANO, Napoleón., et al. 2013. p.7)

*Oligoelementos:* Llamados también microelementos, son aquellas sustancias que se encuentran en las aguas minerales en forma de iones y poseen una concentración menor a 1mg/L. Estos elementos aunque a tan bajas concentraciones, desempeñan un papel importante en la caracterización de cada agua y en los efectos, ya sean beneficiosos (selenio, hierro, manganeso, zinc) o tóxicos (plomo, cadmio, mercurio) para el consumidor. Así tenemos que las aguas provenientes de suelos sedimentarios y arcillosos son ricas en oligoelementos, y aquellas que brotan a través de rocas arsénicas y graníticas son pobres en ellos. (RODÉS, Benito. 2000. p.78)

*Radiactividad:* Es un fenómeno natural por el cual ciertos átomos cambian su estructura, pudiendo ser radiación alfa cuando hay una pérdida de dos protones, beta cuando un neutrón se convierte en protón o viceversa, y gamma cuando hay un exceso de energía liberada como rayos gamma. (NONUCLEAR: [http://www.nonuclear.org.ar/sitio/archivo\\_informes/conceptos\\_basicos\\_sobre\\_radiac.pdf](http://www.nonuclear.org.ar/sitio/archivo_informes/conceptos_basicos_sobre_radiac.pdf)). Normalmente todas las aguas naturales poseen radiactividad, pero esta se ve más elevada en las aguas termales, y basándose en el Real Decreto Español 1138/1990 para aguas de consumo público, esta debe ser de 0,1Becquerelio/Litro tanto para radiactividad alfa total como para reactividad beta total. (RODÉS, Benito. 2000. p.80).

#### **1.3.4. Clasificación de las Aguas Termales**

##### *1.3.4.1. Clasificación Geológica- Genética*

INAMHI, 2013 citado por White, las aguas subterráneas, por el aspecto geológico- genético se clasifican en:

Agua meteórica: agua subterránea que forma parte del ciclo hidrológico reciente.

Agua Congénita: ha estado fuera del contacto con la atmosfera durante millones de años.

Agua Metamórfica: permanece en contacto con las rocas durante su metamorfismo.

Agua Magmática: originada en el interior de los magmas de poca profundidad.

Agua Plutónica: originada en el interior de los magmas de gran profundidad.

Agua Juvenil: nunca ha estado en contacto con la atmosfera.

(BURBANO, Napoleón., et al. 2013. p.10)

### ***1.3.4.2. Clasificación por su Temperatura***

INAMHI, 2013 citado por Schoeller, considera la temperatura media anual del aire (Tma) o la temperatura del suelo (Ts) del que emerge el manantial, para clasificar las aguas termales en:

Aguas frías: menos de 20°C

Aguas Hipotermas: entre 20 y 30°C

Aguas Mesotermas: entre 30 y 40°C

Aguas Hipertermas: más de 40°C

(BURBANO, Napoleón., et al. 2013. p.10)

### ***1.3.5. Clasificación por su composición química***

INAMHI, 2013 citado por Kurlov, toma en cuenta los aniones y cationes superiores al 20%, para clasificar las aguas termales en:

Aguas con aniones predominantes:

Bicarbonatadas

Sulfatadas

Cloruradas

Bicarbonatas sulfatadas

Bicarbonatadas cloruradas

Sulfatadas cloruradas

Sulfatadas cloruradas bicarbonatadas

(BURBANO, Napoleón., et al. 2013. p.10)

Aguas con cationes predominantes:

Cálcicas

Magnésicas

Sódicas

Cálcicas magnésicas

Cálcicas sódicas

Magnésicas sódicas

Cálcicas magnésicas sódicas

### ***1.3.6. Clasificación según residuo seco***

TERMARED, 2013 clasifica las aguas atendiendo a su residuo seco a 110°C:

Oligometálicas: no superior a 100mg/L

De mineralización muy débil: entre 100 y 250 mg/L

De mineralización débil: entre 250 y 500 mg/L

De mineralización media: entre 500 y 1000 mg/L

De mineralización fuerte: superior a 1000 mg/L.

(TERMARED:

[http://www.termared.com/docs/repositorio/es\\_ES/investigacion/aguas-mineromedicinales.pdf](http://www.termared.com/docs/repositorio/es_ES/investigacion/aguas-mineromedicinales.pdf))

### 1.3.7. Clasificación por su salinidad

La conductividad eléctrica se refiere a la capacidad del agua para conducir la corriente eléctrica, la cual está directamente relacionada con la concentración de sales disueltas en agua, y por ende con la cantidad de sólidos totales disueltos (STD). (BURBANO, Napoleón., et al. 2013. p.12).

**Cuadro 10-1:** Clasificación de las aguas Termominerales por su salinidad

CLASIFICACION	STD (mg/L)
Baja salinidad	0 a 60
Salinidad media	160 a 480
Salinidad alta	480 a 1440
Salinidad muy alta	Mayor a 1440

Fuente: BURBANO, Napoleón., et al. 2013. p.12

### 1.3.8. Clasificación según la acción terapéutica

GEOLOGÍA Y RECURSOS DEL ECUADOR, 2011 citado por Amadeo Barabino, tomando en cuenta la acción terapéutica y el contenido químico, en base a los compuestos predominantes las aguas termales y medicinales se clasifican en:

**Cuadro 11-1:** Clasificación de las aguas minerales, según Barabino Amadeo

Acción Fisiológica	Tipo	Agua correspondientes
Digestiva	Eupéptica	Acídulas, alcalinas,
		Cloruradas, sulfuradas
	Purgativa	Cloruradas (acción suave)
		Sulfurosas
		Sulfatadas
	Alterante	Bromuradas
Ioduradas		
Cardiovascular	Estimulante	Cloruradas
		sulfurosas
	Diluyente	Alcalinas (en altas dosis)
	Reconstituyente	Acídulas Ferruginosas
Respiratoria	Sedativa	Acídulas
	Alterante	Alcalinas, ferruginosas, ioduradas y sulfurosas
Urinaria	Diluyente	Acídulas, cloruradas, sulfurosas, sulfatadas (de base alcalina)
	Estimulantes	Alcalinas
Genital	Estimulante	Alcalinas, sulfurosas, ferruginosas
	Emenagoga	Sulfurosas
	Específica	Ioduradas, sulfurosas, bromuradas
	modificadora	Ioduradas
	Sedante	Sulfatadas
Nerviosa	Estimulante	Acídulas, alcalinas, sulfurosas

Fuente: PALADINES: <http://www.geologiaecuador.com/2011/04/aguas-termales-minerales-y-naturales-de.html>

### **1.3.5. Microbiología de las aguas termomedicinales**

Las aguas naturales ya sean superficiales o profundas rara vez son estériles, y en el caso de las aguas termomedicinales presentan una gran diversidad de microorganismos como consecuencia de la relación entre los organismos y el ambiente. Estas a pesar de ser consideradas como uno de los hábitats más extremos debido a sus altas temperaturas y elevadas concentraciones de sales, poseen una población microbiana propia de cada tipo de agua que depende de sus características físico- químicas. (DE LA ROSA, María. 2000. p. 154).

Los manantiales con pH alcalino no poseen una gran diversidad microbiana (*Pseudomonas*, *Bacillus* y *Exiguobacterium*), los de pH ácido por su parte poseen un pequeño número de bacterias, principalmente bacilos Gram positivos. (DE LA ROSA, María. 2000. p. 154).

#### **1.3.5.1. Microorganismos Autóctonos**

Estos microorganismos son propios de cada tipo de agua y dependen de sus propiedades fisicoquímicas como temperatura, pH, sales minerales y nutrientes. Esta población microbiana suele ser alta en el punto de emergencia, aproximadamente de  $10^6$  /mL, la mayoría de ellos suelen ser inactivos y tienen un mejor crecimiento en medios pobres en carbono, durante tiempos de incubación prolongados. El número de bacterias esporuladas es bajo, las bacterias termófilas crecen a más de 45°C, de ellas la mayoría son mesófilas con temperaturas óptimas a 37°C. Según sus requerimientos nutricionales predominan las bacterias heterótrofas oligotróficas que necesitan carbono y nitrógeno, estas no suelen fermentar azúcares, pero son proteolíticas, amilolíticas, amonificantes y celulolíticas, tipos que se consideran beneficiosos porque intervienen en la autodepuración de las aguas. En menor número están los microorganismos autótrofos (cianobacterias, bacterias verdes y rojas). La mayoría son aerobias o anaerobias facultativas. (DE LA ROSA, María. 2000. p. 155).

En aguas sulfurosas se encuentran bacterias que oxidan azufre y sulfhídrico, y también sulforreductoras, las cuales son consideradas perjudiciales ya que pueden producir corrosión de hierro por la producción de sulfhidrilo. En aguas ferruginosas están las bacterias que oxidan el ion ferroso a férrico. En aguas cloruradas sódicas e hipertónicas es frecuente la presencia de bacterias halófilas moderadas y halotolerantes que resisten una elevada osmolaridad. (DE LA ROSA, María. 2000. p. 155).

En cuanto a las bacterias heterótrofas, las aguas hipertermales presentan una mayor proporción de bacterias Gram positivas, ya que son más resistentes al calor, entre las principales están los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Enterobacter*, *Acinobacter* y *Arthrobacter*. En las aguas mesotermas predominan los bacilos Gram negativos como: *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Vibrio*, *Aeromonas*; y los cocos Gram positivos como: *Staphylococcus* y *Micrococcus*, los cuales resisten concentraciones altas de sal. (DE LA ROSA, María. 2000. p. 156).

#### 1.3.5.2. *Microorganismos Alóctonos*

Estos microorganismos proceden de otros hábitats, están considerados como contaminantes y pueden proceder del suelo, heces o vegetación, estos coexisten con los microorganismos autóctonos adaptándose a las condiciones adversas de este tipo de aguas. Dentro de ellos los de mayor interés sanitario son: *Coliformes*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Legionella*. La presencia de *Coliformes* de origen fecal se considera un grave riesgo sanitario, al igual que la *P. aeruginosa* ya que ambas son bacterias patógenas y pueden producir infecciones, su presencia puede indicar una escasa protección del manantial. Además de ello es común encontrar, pero en poca proporción algas y hongos, principalmente de géneros *Penicillium*, *Aspergillus* y *Alternaria*, recalando que estos cuando se encuentran en mínimas cantidades no afectan a la calidad sanitaria de las aguas. (DE LA ROSA, María. 2000. p. 156).

#### 1.3.6. *Las Aguas Termominerales en el Ecuador*

Nuestro país se encuentra dentro del Circulo de Fuego del Pacifico, esta ubicación geográfica permite que las aguas subterráneas que circulan por nuestros suelos adquieran un grado geotérmico alto que, en la superficie se manifiestan por surgencias de aguas calientes, ligadas a rocas volcánicas continentales, lo que convierte al Ecuador en un país privilegiado en aguas termales y minerales, localizadas especialmente en el callejón Interandino. (BURBANO, Napoleón., et al. 2013. p.5)

GEOLOGÍA Y RECURSOS DEL ECUADOR, 2011, citado por Wolf : “El Ecuador es un país es muy rico en aguas termales y minerales de toda clase, pero el uso que se hace de ellas es casi nulo. Es conocido cuantos progresos ha hecho en el mundo civilizado la Hidrología Medicinal, también podemos determinar cuán preciosos remedios poseemos en ciertas aguas minerales para el tratamiento

de varias enfermedades. El Ecuador posee tales aguas en abundancia; pero sus médicos desconocen sus aplicaciones médicas, no se mencionan en las Farmacopeas de Europa, ERGO: no valen nada; nuestras aguas no se recomiendan como las de Vichy, Karlsbad, Selter, etc., en los periódicos; ERGO: vengan las extranjeras, cuesten lo que cuesten.” (PALADINES: [www.geologiaecuador.com/2011/04/aguas-termales-minerales-y-naturales-de.html](http://www.geologiaecuador.com/2011/04/aguas-termales-minerales-y-naturales-de.html)).

Las aguas termales y minerales del país, tienen un origen genético relacionado con aparatos volcánicos jóvenes y sistemas de fallas y fisuras. Estas aguas brotan del interior de la tierra, en donde por procesos geodinámicos y termodinámicos se encuentran a temperaturas muy elevadas y con alto grado de mineralización, documentándose así 167 fuentes de aguas termales y minerales; y más de 1000 manantiales de aguas fresca de montaña. (BURBANO, Napoleón., et al. 2013. p.5)

GEOLOGÍA Y RECURSOS DEL ECUADOR, 2011, por su composición química y mineralógica, clasifica la cantidad de manantiales correspondientes a cada tipo como lo muestra el cuadro 13-1.

**Cuadro 12-1:** Clasificación de las aguas termales y minerales del Ecuador según su composición química y mineralología.

<b>TIPO</b>	<b>CANTIDAD</b>
Cloruradas	<b>9</b>
Acídulo-alcalinas	19
Bicarbonatadas alcalinas y mixtas	40
Ferruginosas y Arsenicales	15
Sulfuradas	5
Sulfatadas alcalinas y mixtas	7
Radioactivas	2
Raras	2
No estudiadas	<b>68</b>

Fuente: PALADINES: <http://www.geologiaecuador.com/2011/04/aguas-termales-minerales-y-naturales-de.html>

INAMHI, 2013, indica el porcentaje de manantiales termales del país, según su temperatura, como se detalla en el cuadro 14-1.

**Cuadro 13-1:** Clasificación de aguas termales y minerales del Ecuador por su temperatura.

<b>TIPO</b>	<b>PORCENTAJE %</b>
Hipertermal	27
Termal	17
Hipotermal	41
Fría	16

Fuente: BURBANO, Napoleón., et al. 2013. p.10

### 1.3.6.1. Aguas Termales “Los Elenes”

El Parque Acuático Los Elenes, está ubicado en el Barrio Santa Teresita, a dos kilómetros del cantón Guano, provincia de Chimborazo, imagen 6-1. La temperatura ambiente promedio del lugar está entre 15 y 17°C, es decir posee un clima templado. (AME: <http://www.ame.gov.ec/ame/index.php/ley-de-transparencia/65-mapa-cantones-del-ecuador/mapa-chimborazo/263-canton-guano>).

**Imagen 6-1:** Ubicación de las Aguas Termales Los Elenes



Fuente: BURBANO, Napoleón., et al. 2013. p.43

Las aguas termales de este balneario se encuentran a 2608 msnm, brotan de la peña de Langos, tienen una temperatura de aproximadamente 22 °C y son ricas en minerales. Hasta este lugar acuden muchos turistas de todo el país para aliviar los malestares producidos por el reumatismo, artritis, parálisis, la gota entre otras. (MUNICIPIO DE GUANO: <http://www.municipiodeguano.gov.ec/ot/index.php/sample-sites/shop/lugares/133-parque-acuatico-los-elenes>).

### 1.3.6.2. Características

INAMHI, 2013 realizó un estudio de las aguas Termominerales del Ecuador, en donde ubica a las aguas termales de Los Elenes con las características descritas en el cuadro 15-1.

**Cuadro 14-1:** Información Básica y Características de las aguas termales de Los Elenes

<b>LOCALIDAD</b>	Los Elenes (Guano)
<b>T° AMBIENTE</b>	15 y 17°C
<b>CUENCA</b>	Pastaza
<b>PROVINCIA</b>	Chimborazo
<b>H.TOPOGRAFICA</b>	Guano
<b>PROPIETARIO</b>	Municipio de Guano
<b>COTA (m.s.n.m)</b>	2590
<b>pH</b>	7.75
<b>STD (solidos totales disueltos)</b>	1240
<b>T (°C)</b>	22.7
<b>USO</b>	Recreación
<b>TIPO</b>	Hipotermal

Fuente: BURBANO, Napoleón., et al. 2013. p.43

**Imagen 7-1:** Análisis realizados por el INAMHI en las Aguas Termales de Los Elenes

BALANCE TONICO					
ANION	mg/l	CATION	mg/l	OTRAS DETERMINACIONES	
CO <sub>3</sub> H-	370,00	Na+	158,84	Parámetros	
CO <sub>3</sub> =	0,0	K+	11,91	pH	7,8
SO <sub>4</sub> =	899,5	Ca <sup>++</sup>	84,00	CE (µs/cm)	1938
Cl-	28,79	Mg <sup>++</sup>	128,9	DUREZA (mg/l)	732
NO <sub>3</sub> -	1,18	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0,287	TEMPERAT (°C)	22,70
NO <sub>2</sub>	<0,05	Fe <sup>=</sup>	<0,5		
PO <sub>4</sub> =	<0,5				
OTRAS DETERMINACIONES					
Turbidez	3		Cobre	<0,25	
Color	127		Cromo	<1	
Alcalinidad	370		Plomo	<1	
STD	1253,886		SiO <sub>2</sub>	70,01	
CO <sub>2</sub>	13,09		Mn	#,REF1	
OBSERVACIONES:					
TIPO DE AGUA					
SULFATADA MAGNESICA					
HIPOTERMAL					

**CLASIFICACION HIDROQUIMICA**

Fuente: BURBANO, Napoleón., et al. 2013. p.43

## CAPITULO 2

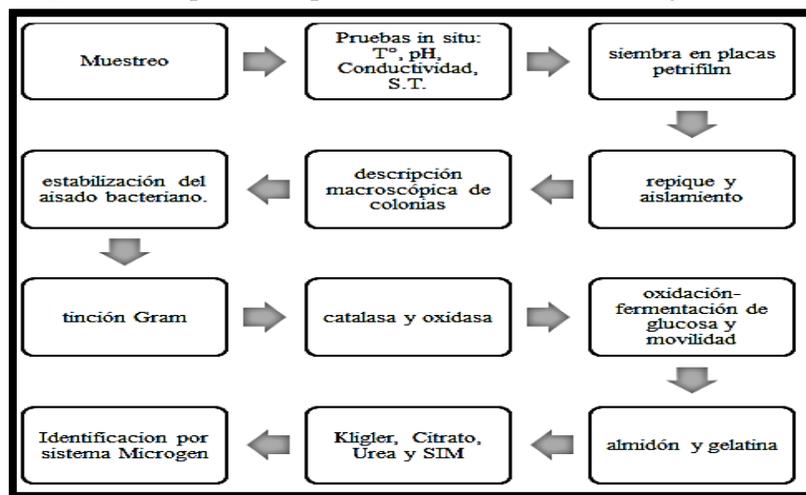
### METODOLOGÍA

#### 2.1. Población de Estudio y localización del Muestreo

La población de estudio son los microorganismos *Aerobios mesófilos*, *Coliformes* totales y fecales, *Staphylococcus*, mohos y levaduras presentes en las Aguas Termomedicinales del Parque Acuático Los Elenes, ubicado en el cantón Guano, provincia de Chimborazo.

#### 2.2. Metodología

**Imagen 1-2:** Esquema del proceso de análisis microbiológico.



Realizado por: Evelyn Ocaña

##### 2.2.1. Muestreo

Lavarse bien las manos y antebrazos, colocarse las prendas de protección, tomar la muestra en contracorriente, cerrar el frasco y sellarlo fuera del agua. Además de ello se seguir lo indicado por las normas NTE INEN 1105:1983 Agua. Muestreo para análisis microbiológico y NTE INEN 2169:2013 para manejo y conservación de muestras.

## 2.2.2. Pruebas Físico- Químicas in situ (Temperatura, pH, Conductividad y Sólidos totales)

Estas pruebas se realizan in situ, es decir a pie de manantial: con las debidas normas de asepsia analizar la muestra con ayuda del equipo multiparámetro y realizar la lectura correspondiente a cada uno de los parámetros.

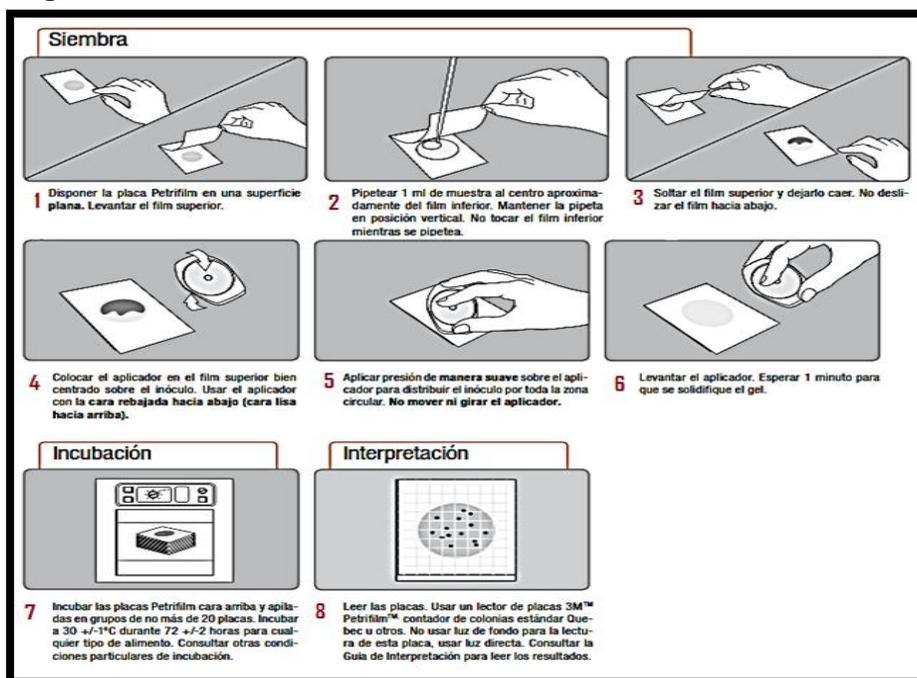
## 2.2.3. Análisis Microbiológico

### 2.2.3.1. Siembra en placas petrifilm (duplicado)

1. Colocar en la placa petrifilm respectiva (Aerobios, *E. coli/ Coliformes*, *Staphylococcus aureus*, mohos y levaduras) 1mL de la muestra.
2. Incubar a 37°C por 24 horas, excepto para mohos y levaduras, en la que varía a 25°C por un periodo de 7 días.
3. Realizar conteo y expresar los resultados como unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL).

(3M™PETRIFILM™: [http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat/workshopmrama/files/Petrifilm\\_guias.pdf](http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat/workshopmrama/files/Petrifilm_guias.pdf))

**Imagen 2-2:** Instrucciones de uso de Placas Petrifilm.



Fuente:3M™: [http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat/workshopmrama/files/Petrifilm\\_guias.pdf](http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat/workshopmrama/files/Petrifilm_guias.pdf)

En el caso de las bacterias desarrolladas en las placas STX, se debe colocar el disco para *Staphylococcus*, dejarlo por dos horas y observar las características de las colonias.

Las bacterias que hayan crecido en las placas EC y hayan producido gas se las considera como *Escherichia coli*.

(3M™PETRIFILM™: [http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat/workshopmrama/files/Petrifilm\\_guias.pdf](http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat/workshopmrama/files/Petrifilm_guias.pdf))

#### 2.2.3.2. Descripción macroscópica de colonias

1. Una vez pasado el tiempo de incubación observar las placas en contra luz.
2. Identificar la forma de las colonias (circular, puntiforme, irregular, etc.)
3. Observar:
  - bordes (entero, ondulado, filamentoso)
  - superficie (lisa, rugosa, plegada)
  - consistencia (cremosa, membranosa).
  - Color
  - Luz transmitida a través de la colonia (opaca, translúcida, transparente)
  - Luz reflejada en la superficie de la colonia (opaca, brillante)

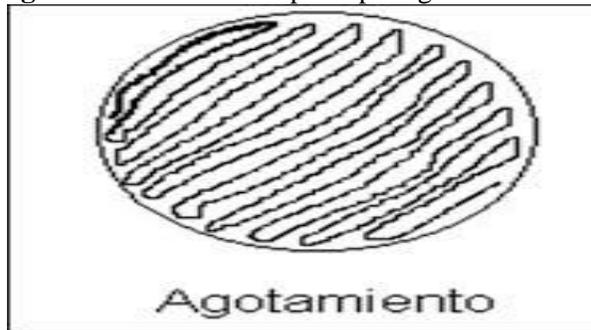
(MICRODONTO: <https://microdonto.files.wordpress.com/2009/03/morfologia-de-las-colonias-bacterianas.pdf>)

#### 2.2.3.3. Estabilización del aislado bacteriano

1. Preparar Agar Mueller Hinton (medio de cultivo no selectivo que promueve el desarrollo microbiano):
  - Suspender los gramos respectivos de polvo en la cantidad de agua purificada que se requiera (38g en 1L de agua destilada), dependiendo la cantidad de placas a preparar.
  - Calentar con agitación frecuente y hervir hasta que se disuelva totalmente.
  - Enfriar y distribuir en las placas Petri estériles, en volumen apropiado aproximadamente 4mm sobre una superficie horizontal.
2. Realizar el primer repique:
  - Con un palillo estéril tocar la colonia que se desea aislar, y picar sobre la placa con Agar Mueller Hinton, para ello se usa una cuadrícula que nos sirva de guía para sembrar nuestras colonias.
  - Incubar a 35°C durante 24 horas.

- Observar las características macroscópicas.
3. Realizar el segundo y tercer repique:
    - Partiendo de las colonias que crecieron en el Agar Mueller Hinton, realizar el segundo repique, siguiendo los mismos pasos del primero.
    - Partiendo de las colonias que crecieron en el segundo repique, realizar el tercer repique, siguiendo los mismos pasos del primero.
  4. Con cada colonia crecida a partir del último repique realizado, hacer una siembra por agotamiento o en estría:
    - Tocando con suavidad la superficie del medio, extender la muestra como se observa en el gráfico, tratando de que el extendido sea lo más largo posible con el objetivo de conseguir al final del mismo células aisladas.

**Imagen 2-3:** Extendido de placa por agotamiento



**Fuente:** SÁNCHEZ: <https://sites.google.com/a/goumh.umh.es/practicas-de-microbiologia>

- Al destapar la placa mantener la tapa en la mano, abriéndola solo lo necesario para realizar la siembra.
- Cerrar la placa e incubar en posición invertida a 37°C, durante 24 horas.

#### 2.2.3.4. Tinción Gram

Una vez estabilizado el aislado bacteriano, realizar la tinción Gram con cada una de las colonias:

1. Tomar una pequeña muestra de la cepa y diluirla en la solución salina colocada en el porta objetos.
2. Con ayuda del mechero fijar la muestra, sin calentar más de lo que la mano puede soportar.
3. Colocar cristal violeta esperar 1 minuto y enjuagar.
4. Colocar lugol esperar 1 minuto y enjuagar.
5. Colocar alcohol cetona esperar 50 segundos y enjuagar.

6. Colocar safranina esperar 1 minuto y enjuagar.
  7. Secar la muestra y observar en el microscopio a 100X.
- (VIZCARRODO. Milagros., & GUTIÉRREZ. Sofia. 2008. p.5).

Si después de realizar tinción Gram las bacterias desarrolladas en la placa STX, resultan como cocos Gram Positivos, se confirma que las mismas corresponden a bacterias del genero Staphylococcus.

#### 2.2.3.5. Prueba de la Oxidasa

1. Con una tirilla para prueba de oxidasa tocar la colonia recién reactivada.
  2. Observar el resultado: si la tirilla se torna azul se considera oxidasa positiva, si la tirilla no sobre ningún cambio se considera oxidasa negativa.
  3. Repetir este proceso con cada una de las colonias puras reactivadas.
- (FERNÁNDEZ, Ana., et al. 2010. p. 6)

#### 2.2.3.6. Producción de catalasa

1. Emulsionar una colonia en un portaobjeto con una gota de agua oxigenada de 10 volúmenes.
  2. Observar si existe desprendimiento de burbujas, lo que corresponde a una prueba positiva.
- (FERNÁNDEZ, Ana., et al. 2010. p. 6)

#### 2.2.3.7. Oxidación- fermentación de la glucosa

1. Preparar un medio Hugh y Leifson (medio usado para determinar el metabolismo oxido fermentativo de las bacterias Gram negativas):
  - Para 1L de medio: disolver 2g de triptona, 5g de cloruro sódico y 0,3g de fosfato dipotásico en 1L de agua destilada.
  - Ajustar a pH 7,1.
  - Añadir 15 mL de azul de bromotimol al 2% y 3g de Agar, calentando hasta ebullición.
  - Distribuir en cantidades de 100mL y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.
  - Atemperar a 45- 50°C y añadir asepticamente a 100mL de medio estéril, 10mL de una solución de glucosa al 10% esterilizada por filtración, mezclando a fondo.
  - Dispensar asepticamente 5mL en tubos estériles, manteniéndolos en posición vertical.
  - Debe prepararse la cantidad suficiente para realizar la prueba por duplicado.

2. Con ayuda de la aguja, sembrar cada colonia reactivada en dos tubos del medio preparado.
3. A uno de los tubos, luego de sembrada la bacteria, recubrirlo con vaselina estéril.
4. Incubar a 30°C durante 72 horas.
5. Observar los resultados: tanto la producción de ácido a partir de glucosa por vía fermentativa (tubo con vaselina) como la producción de ácido a partir de glucosa por vía oxidativa (tubo sin vaselina) se observan por un cambio de color del indicador de violeta a amarillo.

(BARROW, G., & FELTHAM, R. 1993. p. 198)

#### 2.2.3.8. Observación de la movilidad

1. Preparar agar movilidad (medio usado para determinar la movilidad de un bacilo Gram negativo):
  - Para 1L de agar: disolver 3g de extracto de carne, 10g de peptona, 5g de cloruro sódico y 4g de agar en 1L de agua destilada.
  - Ajustar el pH a 7,3.
  - Distribuir en tubos en cantidades de 5mL.
  - Esterilizar a 121°C durante 15 minutos y dejar solidificar en posición vertical.
2. Sembrar por picadura cada una las colonias reactivadas en el agar preparado.
3. Observar si el crecimiento sobrepasa la línea sembrada, lo que indica que la bacteria tiene movilidad.

Si las bacterias Gram negativas inoculadas tanto en medio O/F, como en agar movilidad, dieron resultados positivos y en la prueba de oxidasa dieron resultados negativos, se las considera como bacterias *E. coli*. (BARROW, G., & FELTHAM, R. 1993. p. 198)

#### 2.2.3.9. Hidrolisis de almidón

1. Preparar agar almidón ( medio usado para determinar bacterias que tengan enzima amilasa, capas de hidrolizar el almidón):
  - Para 1L de agar: disolver 3g de peptona, 10g de almidón soluble y 12g de agar en 1L de agua destilada, por calentamiento suave.
  - Ajustar el pH a 7,5.
  - Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.
  - Distribuir en cajas Petri estériles.
2. Sembrar por repique cada una de las colonias Gram positivas reactivadas.

3. Incubar a 30°C durante 8 días.
4. En las colonias desarrolladas colocar 3 gotas de lugol.
5. Observar los resultados: positivos para hidrolisis de almidón si alrededor de la colonia aparece una zona clara. (BARROW, G., & FELTHAM, R. 1993. p. 200)

#### 2.2.3.10. Hidrolisis de Gelatina

1. Preparar Agar Gelatina (medio usado para determinar la capacidad de las bacterias para producir enzimas proteolíticas que licuan gelatina):
  - Para 1L de agar: disolver por calentamiento suave, 3g de extracto de carne, 30g de gelatina y 12g de agar en 1L de agua destilada.
  - Ajustar el pH a 7.2.
  - Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.
  - Distribuir en cajas Petri estériles.
2. Inocular por repique cada una de las bacterias Gram Positivas reactivadas.
3. Incubar a 30°C durante 8 días.
4. En las colonias desarrolladas colocar unas gotas de cloruro mercúrico (12g de cloruro mercúrico y 16mL de ácido clorhídrico concentrado en 80mL de agua destilada).
5. Observar los resultados: positivos para hidrolisis de gelatina si se produce una zona clara alrededor de la colonia.

Si las bacterias Gram positivas sembradas tanto en agar movilidad, como en agar gelatina dan resultados positivos, se las considera como bacterias del genero *Bacillus spp.* (BARROW, G., & FELTHAM, R. 1993. p. 198)

#### 2.2.3.11. Pruebas Bioquímicas: Kligler, SIM, Urea y Citrato

Para las bacterias Gram Negativas y oxidasa positivas, realizar las pruebas bioquímicas:

##### *Agar Hierro Kligler*

1. Suspender los gramos respectivos de polvo en la cantidad de agua purificada que se requiera (54.8g en 1L de agua destilada), dependiendo la cantidad tubos que se necesite.
2. Calentar con agitación frecuente y hervir hasta que se disuelva totalmente.

3. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.
4. Distribuir en tubos estériles, a razón de 4-5mL, en forma de pico de flauta, tapar los tubos con corchos también estériles.
5. Calentar al rojo vivo la aguja de inoculación, enfriarla y tocar la colonia que se desea sembrar en el tubo.
6. Destapar el tubo, colocando la tapa entre el dedo meñique y anular. Flamear la boca del tubo.
7. Sembrar por picadura la colonia aislada. Retirar la aguja siguiendo el camino de entrada.
8. Sin volver a recargar el asa, sembrar en estría la superficie del pico de flauta.
9. Calentar la aguja al rojo vivo después de la inoculación.
10. Incubar a 30-35°C durante 18-24 horas.
11. Observar los resultados:

Producción de ácido a partir de glucosa: la parte inferior de medio hay un cambio de color debido al indicador de pH que pasa de rojo a amarillo.

Producción de gas glucosa (CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>): se aprecian por la aparición de burbujas en la parte inferior del tubo, producción de grietas o incluso la elevación del medio.

Producción de lactosa: se parecía por un cambio de color en el pico de flauta que pasa de rojo a amarillo.

Producción de sulfhídrico: se aprecia por un ennegrecimiento del medio en la línea de inoculación o sobre la capa superficial, en algunos casos llega a ennegrecerse todo el medio. (ÁLVAREZ, María., & BOQUET, Ernesto. 1990. p. 140 )

#### *Medio SIM (Sulfuro- Indol- Movilidad)*

1. Suspender los gramos respectivos de polvo en la cantidad de agua purificada que se requiera (30g en 1L de agua destilada), dependiendo la cantidad de tubos que se necesite.
2. Calentar con agitación frecuente y hervir hasta que se disuelva totalmente.
3. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.
4. Distribuir en tubos estériles, a razón de 4-5mL, en forma vertical, tapar los tubos con corchos también estériles.

5. Calentar al rojo vivo la aguja de inoculación, enfriarla y tocar la colonia que se desea sembrar en el tubo.
6. Destapar el tubo, colocando la tapa entre el dedo meñique y anular. Flamear la boca del tubo.
7. Sembrar por picadura la colonia aislada. Retirar la aguja siguiendo el camino de entrada. Flamear la boca del tubo.
8. Calentar la aguja al rojo vivo después de la inoculación.
9. Incubar a 30-35°C durante 18-24 horas.
10. Observar los resultados:

Motilidad: se produce una turbidez en el medio, esta debe extenderse más allá de la línea de siembra.

Producción de SH<sub>2</sub>: se observa un ennegrecimiento a lo largo de la línea de siembra o en todo el medio.

Indol: pasadas las 24h se coloca sobre el medio, cinco gotas del reactivo de Kovac, la aparición de un anillo rojo se considera una prueba positiva. (ÁLVAREZ, María., & BOQUET, Ernesto. 1990. p. 140 ).

#### *Agar Base Urea (Medio de Christensen)*

1. Suspender los gramos respectivos de medio en la cantidad de agua purificada que se requiera (24g en 1L de agua destilada), dependiendo la cantidad de tubos que se necesiten.
2. Calentar con agitación frecuente y hervir hasta que se disuelva totalmente.
3. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.
4. Añadir una solución estéril de urea (100mL para 1L de medio). Esta solución se realiza al 20%, es decir se pesan 20g de urea deshidratada y se disuelven en 100mL de agua destilada. Se esteriliza por filtración, puesto que el calor desnaturaliza la urea.
5. Distribuir en tubos estériles, en forma de pico de flauta, tapar los tubos con corchos también estériles.
6. Calentar al rojo vivo la aguja de inoculación, enfriarla y tocar la colonia que se desea sembrar en el tubo.
7. Destapar el tubo, colocando la tapa entre el dedo meñique y anular. Flamear la boca del tubo.
8. Sembrar por picadura la colonia aislada. Retirar la aguja siguiendo el camino de entrada.
9. Sin volver a recargar el asa, sembrar en estría la superficie del pico de flauta.
10. Calentar la aguja al rojo vivo después de la inoculación.
11. Incubar a 30-35°C durante 18-24 horas.

## 12. Observar los resultados:

La prueba se considera positiva si el medio se torna de un tono rosado, y negativa si mantiene su color original. (ÁLVAREZ, María., & BOQUET, Ernesto. 1990. p. 142 ).

### *Agar Simmons Citrato*

1. Suspender los gramos respectivos de medio en la cantidad de agua purificada que se requiera (24,2g en 1L de agua destilada), dependiendo la cantidad de tubos que se necesiten.
2. Calentar con agitación frecuente y hervir hasta que se disuelva totalmente.
3. Distribuir en tubos a razón de 4-5mL.
4. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos y dejar enfriar en posición inclinada (pico de flauta).
5. Calentar al rojo vivo la aguja, enfriarla y tocar la colonia que se desea sembrar en el tubo.
6. Destapar el tubo, colocando la tapa entre el dedo meñique y anular. Flamear la boca del tubo.
7. Sembrar por picadura la colonia aislada. Retirar la aguja siguiendo el camino de entrada.
8. Sin volver a recargar el asa, sembrar en estría la superficie del pico de flauta.
9. Calentar la aguja al rojo vivo después de la inoculación.
10. Incubar a 30-35°C durante 18-24 horas.
11. Observar los resultados: la positividad de la prueba se confirma si se observa crecimiento sobre el pico de flauta o si existe una variación de color de verde a azul, debido a la alcalinización del medio, ocasionado por la liberación de sodio del citrato utilizado.

(ÁLVAREZ, María., & BOQUET, Ernesto. 1990. p. 142 ).

### *2.2.3.12. Identificación de bacterias*

Una vez realizadas todas las pruebas mencionadas, se comparan los resultados con los cuadros de las características diferenciales para las especies de las principales familias bacterianas, como los que se muestran en las imágenes 2-4, 2-5 y 2-6.

**Imagen 2-4:** Características para la diferenciación de especies de la familia *Enterobacteriaceae*.

	KLIGLER										
	400 Glucosa?	Gas/gluco	260 Lactosa	100 SH <sub>2</sub>	Citrato	Fenilalanina desaminasa	Indol	Lisina decarboxilasa	Manitol	Movilidad	Ureasa
<i>Escherichia coli</i> .....	+	+	+	-	-	-	+	+	+	V <sup>+</sup>	-
<i>Escherichia coli</i> inactivo .....	+	-	V <sup>-</sup>	-	-	-	+	V	+	-	-
<i>Shigella dysenteriae</i> .....	+	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-
<i>Shigella flexneri</i> .....	+	-	-	-	-	-	V	-	+	-	-
<i>Shigella boydii</i> .....	+	-	-	-	-	-	V <sup>-</sup>	-	+	-	-
<i>Shigella sonnei</i> .....	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Edwardsiella tarda</i> .....	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+
<i>Klebsiella ozaenae</i> (1) .....	+	V	V <sup>-</sup>	-	V <sup>-</sup>	-	-	V	+	-	V <sup>-</sup>
<i>Klebsiella rhinoscleromatis</i> (1) .....	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Klebsiella oxytoca</i> .....	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
<i>Enterobacter cloacae</i> .....	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	V <sup>+</sup>
<i>Enterobacter aerogenes</i> .....	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-
<i>Enterobacter agglomerans</i> .....	+	V <sup>-</sup>	V	-	V	V <sup>-</sup>	V <sup>-</sup>	-	+	V <sup>+</sup>	V <sup>-</sup>
<i>Enterobacter gergoviae</i> .....	+	+	V	-	+	-	-	+	+	+	+
<i>Enterobacter sakazakii</i> .....	+	+	+	-	+	V	V <sup>-</sup>	-	+	+	-
<i>Serratia marcescens</i> .....	+	V	-	-	+	-	-	+	+	+	V <sup>-</sup>
<i>Serratia liquefaciens</i> .....	+	V	V <sup>-</sup>	-	+	-	-	V <sup>+</sup>	+	+	-
<i>Serratia rubidaea</i> .....	+	V	+	-	+	-	-	V	+	V <sup>+</sup>	-
<i>Morganella morganii</i> .....	+	V <sup>+</sup>	-	-	-	+	+	-	-	+	+
<i>Proteus mirabilis</i> .....	+	V <sup>+</sup>	-	+	V <sup>+</sup>	+	-	-	-	+	+
<i>Proteus vulgaris</i> .....	+	V <sup>+</sup>	-	+	V <sup>-</sup>	+	+	-	-	+	+
<i>Providencia alcalifaciens</i> .....	+	V <sup>+</sup>	-	-	+	+	+	-	-	+	-
<i>Providencia rettgeri</i> .....	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+
<i>Providencia stuartii</i> .....	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	V <sup>-</sup>

Fuente: ÁLVAREZ, María., & BOQUET, Ernesto. 1990. p. 74

Imagen 2-5: Segunda etapa para la diferenciación de especies de la familia *Enterobacteriaceae*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15 <sup>c</sup>	16 <sup>d</sup>	17	18 <sup>c</sup>
Motility	+	+	+	+	+	+	+	d	-	+	+	d	d	D	+	-	-	D
Yellow pigment	-	-	-	-	D	d	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Red pigment	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	-
MacConkey growth	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d
Simmons' citrate	d	D	+	-	+	d	D	d	D	+	-	D	d	D	+	-	-	D
Christensen's citrate	+	+	+	+	+	+	D	+	+	+	d	d	+	+	+	-	+	D
Urease	-	-	d	-	D	-	-	-	D	-	+	+	D	-	D	-	-	D
Gelatin hydrolysis	-	-	-	-	D	d	D	-	D	-	-	+	-	D	+	-	-	-
Growth in KCN medium	+	D	D	-	D	d	D	+	d	+	+	+	+	D	d	-	-	D
H <sub>2</sub> S (PbAc paper)	-	-	d	+	-	-	-	d	-	d	+	+	d	d	D	-	-	-
H <sub>2</sub> S from TSI	-	-	D	+	-	-	-	-	-	-	-	d	-	d	-	-	-	-
Gluconate	-	D	-	-	+	-	-	+	D	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Malonate	+	D	D	-	d	d	D	d	D	+	-	-	-	D	D	-	-	-
ONPG	+	+	+	-	+	+	+	+	D	+	-	-	-	D	+	d	-	+
Phenylalanine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
Arginine dihydrolase	-	+	+	-	D	-	D	-	D	-	-	-	-	d	-	d	-	-
Lysine decarboxylase	-	-	-	+	D	-	D	+	D	d	-	-	-	D	D	-	-	-
Ornithine decarboxylase	+	D	d	+	+	-	D	+	-	+	+	D	-	D	D	d	-	D
Selenite reduction	-	D	+	d	+	-	+	+	d	+	d	d	d	+	d	d	-	D
Casein hydrolysis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	d	-	-	-
DNase production	-	-	-	-	D	-	-	-	-	-	-	+	d	D	D	-	-	-
Carbohydrates [in Peptone Water medium], gas from glucose acid from:	-	D	+	+	+	-	+	+	D	+	+	+	D	D	D	-	-	-
adonitol	-	-	D	-	D	-	D	-	+	-	-	-	D	-	D	-	-	-
arabinose	+	-	+	d	+	+	+	+	+	+	-	-	-	D	D	+	-	+
cellobiose	+	+	+	-	+	d	D	d	+	+	-	-	-	D	d	-	-	D
dulcitol	-	-	D	-	-	-	D	-	D	-	-	-	-	D	-	-	-	-
glycerol	d	D	d	d	d	d	D	+	+	d	d	+	d	D	+	d	-	+
inositol	-	-	-	-	D	-	-	+	+	-	-	-	D	D	+	-	-	D
lactose	+	D	+	-	+	d	d	-	D	+	-	-	-	D	D	-	-	D
maltose	+	+	+	+	+	d	+	+	+	+	-	D	-	D	+	d	-	+
mannitol	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	D	+	+	-	+
raffinose	+	D	D	-	+	d	D	-	+	+	-	-	-	D	d	d	-	D
rhamnose	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	D	D	D	D	-	D
salicin	+	+	D	-	+	+	d	d	+	+	-	D	D	D	+	-	+	D
sorbitol	-	D	+	-	D	d	D	d	+	d	-	-	-	D	D	D	-	D
sucrose	-	D	d	-	+	+	D	-	d	+	-	D	d	-	D	-	+	D
trehalose	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	d	D	D	+	+	+	+
xylose	+	D	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	D	D	-	-	+
starch	-	-	-	-	-	-	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MR test (37 °C) <sup>a</sup>	+	+	+	+	D	d	+	d	d	+	+	+	+	+	d	+	-	+
MR test (RT) <sup>b</sup>	+	D	+	+	-	d	+	-	d	+	+	d	+	+	-	+	+	+
VP test (37 °C) <sup>a</sup>	-	D	-	-	d	-	-	d	D	-	-	-	-	-	D	-	-	-
VP test (RT) <sup>b</sup>	-	D	-	-	d	d	-	+	D	-	-	D	-	-	D	-	-	D
Indole	-	-	d	+	-	-	D	-	D	d	+	D	+	-	-	D	-	D

Further details in Table	7.9b	7.9c	7.9d	7.9e
1 <i>Buttiauxella agrestis</i>				
2 <i>Cedecea</i> spp.				
3 <i>Citrobacter</i> spp.; <i>Levinea</i> spp.				
4 <i>Edwardsiella tarda</i> ; Asakusa biotype; Bartholomew group				
5 <i>Enterobacter</i> spp.				
6 <i>Erwinia herbicola</i> ; <i>Enterobacter agglomerans</i>				
7 <i>Escherichia</i> spp.				
8 <i>Hafnia alvei</i>				
9 <i>Klebsiella</i> spp.				
10 <i>Kluyvera</i> spp.				
11 <i>Morganella morganii</i> ; <i>Proteus morganii</i>				
12 <i>Proteus</i> spp.				
13 <i>Providencia</i> spp.				
14 <i>Salmonella</i> spp. and serotypes				
15 <i>Serratia</i> spp. <sup>c</sup>				
16 <i>Shigella</i> spp. <sup>d</sup>				
17 <i>Tatumella ptyseos</i>				
18 <i>Yersinia</i> spp. <sup>c</sup>				

Fuente: BARROW, G., & FELTHAM, R. 1993. p. 130

**Imagen 2-6:** Características para la diferenciación del genero *Vibrio*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Swarming	-	-	-	d	+	-	?	-	-	-	?	-	?	-
Growth with 0% NaCl	+	+	-	-	-	-	-	d	d	d	-	+	-	-
Møller's decarboxylases:														
arginine	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
lysine	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	d	d	-	-
ornithine	+	+	+	+	d	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrates reduced	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Oxidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Gas from glucose	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Indole	+	+	+	+	+	+	-	d	-	+	-	-	+	-
ONPG	+	+	+	-	-	d	+	+	+	+	-	+	-	d
VP	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	d	-	-
Resistance to														
O/129 10 µg	-	-	d	+	+	d	+	+	+	d	-	-	-	+
O/129 150 µg	-	-	-	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-
ampicillin 10 µg	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	?	d	?	-
polymyxin B 50 i.u.	+	-	d	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hydrolysis of:														
starch	+	-	+	+	+	+	+	+	d	+	?	+	?	+
urea	-	-	-	d	d	d	-	-	-	-	-	-	-	d
Acid from:														
L-arabinose	-	-	-	d	-	-	+	+	+	d	-	-	+	+
arbutin	-	d	+	-	-	d	+	d	-	-	?	d	-	+
salicin	-	-	+	-	d	+	+	d	-	-	-	d	-	+
sucrose	+	-	d	-	d	d	+	+	+	+	-	+	-	+
xylose	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Growth on:														
ethanol	-	-	-	d	d	-	-	+	+	-	?	-	?	d
propanol	-	-	-	+	d	-	?	+	+	-	?	-	?	d
D-galacturonate	-	-	-	-	-	-	?	+	+	-	?	-	?	d
D-glucosamine	+	+	+	+	d	-	?	+	+	+	?	d	?	+

<b>1</b> <i>Vibrio cholerae</i> ; <i>V. comma</i> ; cholera vibrio	<b>5</b> <i>Vibrio alginolyticus</i> ; <i>'Oceonomonas alginolytica'</i>	<b>11</b> <i>Vibrio damsela</i>
<b>2</b> <i>Vibrio mimicus</i>	<b>6</b> <i>Vibrio harveyi</i>	<b>12</b> <i>Vibrio metschnikovii</i>
<b>3</b> <i>Vibrio vulnificus</i>	<b>7</b> <i>Vibrio cincinnatiensis</i>	<b>13</b> <i>Vibrio hollisae</i>
<b>4</b> <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ; <i>'Beneckeia parahaemolytica'</i> ; <i>'Oceonomonas parahaemolytica'</i> ; <i>'Pastemella haemolytica'</i> ; <i>'Pseudomonas enteritis'</i>	<b>8</b> <i>Vibrio fluvialis</i> ; <i>V. fluvialis</i> biotype I	<b>14</b> <i>Vibrio natriegens</i>
	<b>9</b> <i>Vibrio furnissii</i> ; <i>V. fluvialis</i> biotype II	
	<b>10</b> <i>Vibrio anguillarum</i>	

Fuente: BARROW, G., & FELTHAM, R. 1993. p. 123

Si al revisar las tablas (ya sean las referidas, o cualquier otra tabla proveniente de bibliografía confiable), los resultados coinciden con alguna de las bacterias descritas en las mismas se reporta el nombre de la bacteria, si no se logró identificar la bacteria se debe realizar las pruebas bioquímicas de identificación mediante un sistema de sustratos bioquímicos estandarizados.

### 2.2.3.13. Identificación de bacterias mediante el Sistema de Identificación Bioquímica Microgen™

1. Inocular cada colonia en 3-5 mL de solución salina al 0.85% .
2. Colocar de 3-4 gotas(100µL) de la solución en cada pocillo.
3. Colocar de 3-4 gotas de aceite mineral en los pocillos que así lo requieran, es decir donde la guía rápida del producto indique.
4. Incubar de 24-48 horas a una temperatura de 35-37°C.
5. Realizar una lectura inicial de cada pocillo.
6. Adicionar los reactivos necesarios en los pocillos que así lo ameriten, es decir donde la guía rápida del producto indique.

7. Realizar la lectura final de resultados, guiándose en la tabla de colores indicada en la guía rápida del producto.

**Imagen 2-7:** Tabla de colores Microgen™ GnA+B-ID System

Microgen™ GN A ID													
WELL/APFCHEN /GODET	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	7
Reaction	Lysine	Ornithine	H <sub>2</sub> S	Glucose	Mannitol	Xylose	O.N.P.G.	Indole	Urease	V.P.	Citrate	T.D.A.	Nitrate
Negative	Yellow	Green	Yellow	Blue	Blue	Blue	White	Yellow	Yellow	White	Yellow	Yellow	White
Positive	Blue	Blue	Black	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Red	Pink	Red	Blue	Brown	Red

Microgen™ GN B ID													
WELL/APFCHEN /GODET	13								Adonitol	Raffinose	Salicin	Arginine 24hrs	Arginine 48hrs
Negative	White	Yellow	Blue	Blue	Blue	Yellow	Yellow						
Positive	Black	Blue	Yellow	Yellow	Yellow	Blue	Blue						

Fuente: MICROGEN: <http://www.medica-tec.com/arg/files/MICROGEN-GN-ID-MID65%20y%20MID641.pdf>

8. Llenar la hoja de resultados de Microgen, según los valores descritos en la misma, para obtener un valor numérico de 9 dígitos

**Imagen 2-8:** Ejemplo de la hoja de resultados de Microgen

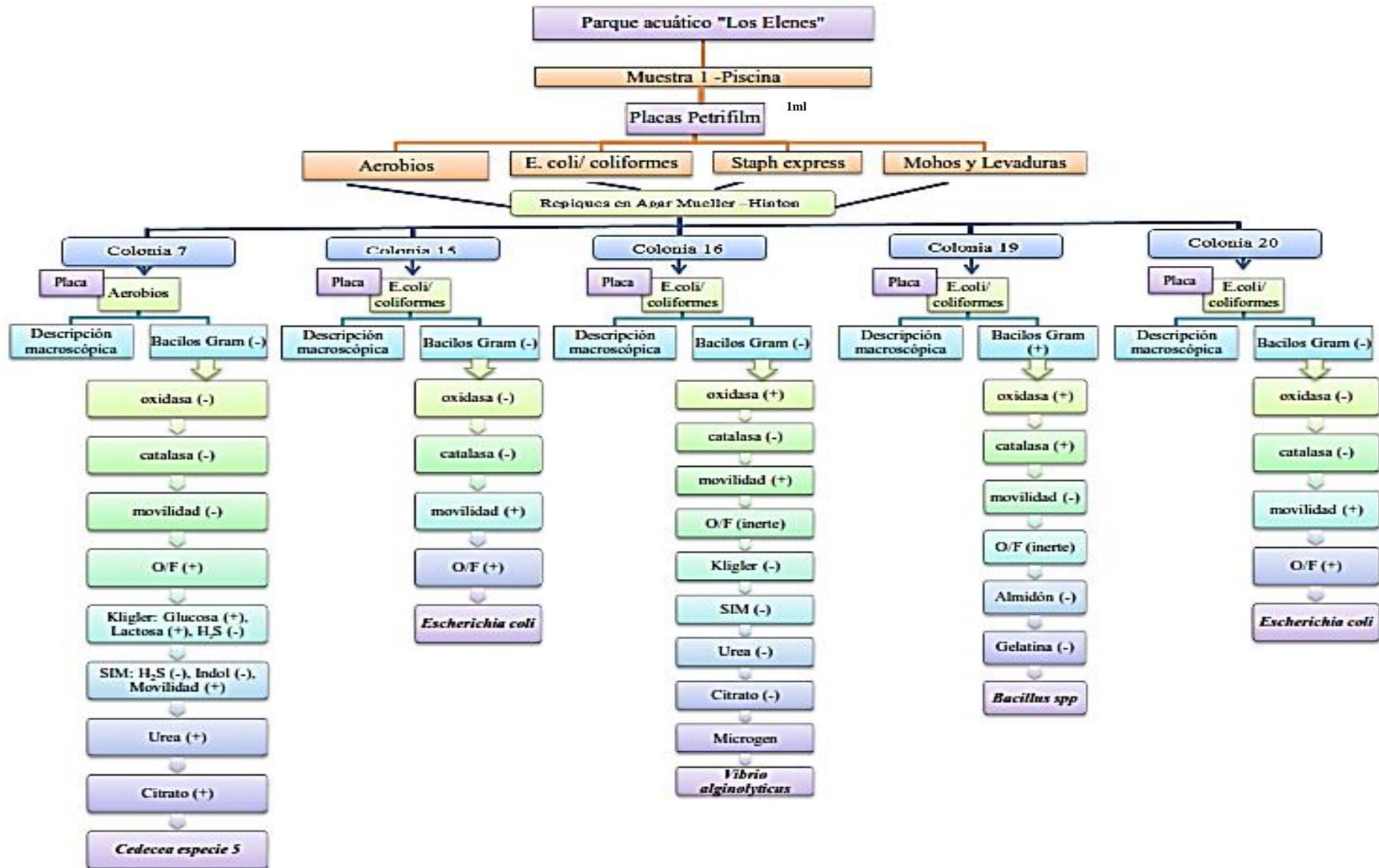
MICROGEN GN-ID A+B PANEL REPORT FORM																											
Lab. No. <b>3341</b>				Specimen Type: <b>CHEESE SANDWICH</b>										Date: <b>28<sup>th</sup> JANUARY 2002</b>													
Well Number	GN A wells												GN B wells														
Reaction	Oxidase	Motility	Nitrate	Lysine	Ornithine	H <sub>2</sub> S	Glucose	Mannitol	Xylose	ONPG	Indole	Urease	V.P.	Citrate	TDA	Gelatine	Malonate	Inositol	Sorbitol	Rhamnose	Sucrose	Lactose	Arabinose	Adonitol	Raffinose	Salicin	Arginine
Result				+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Reaction Index	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1
Sum of Positive Reactions				6	7	6	0	0	7	6	0																
Profile No: <b>67600760</b>				Final Identification: <b>E. coli</b>																							

Fuente: MICROGEN: <http://www.medica-tec.com/arg/files/MICROGEN-GN-ID-MID65%20y%20MID641.pdf>

9. Introducir el perfil numérico en el Software Microgen Identification System, este genera un informe de los cinco microorganismos más parecidos en una base de datos selectiva.

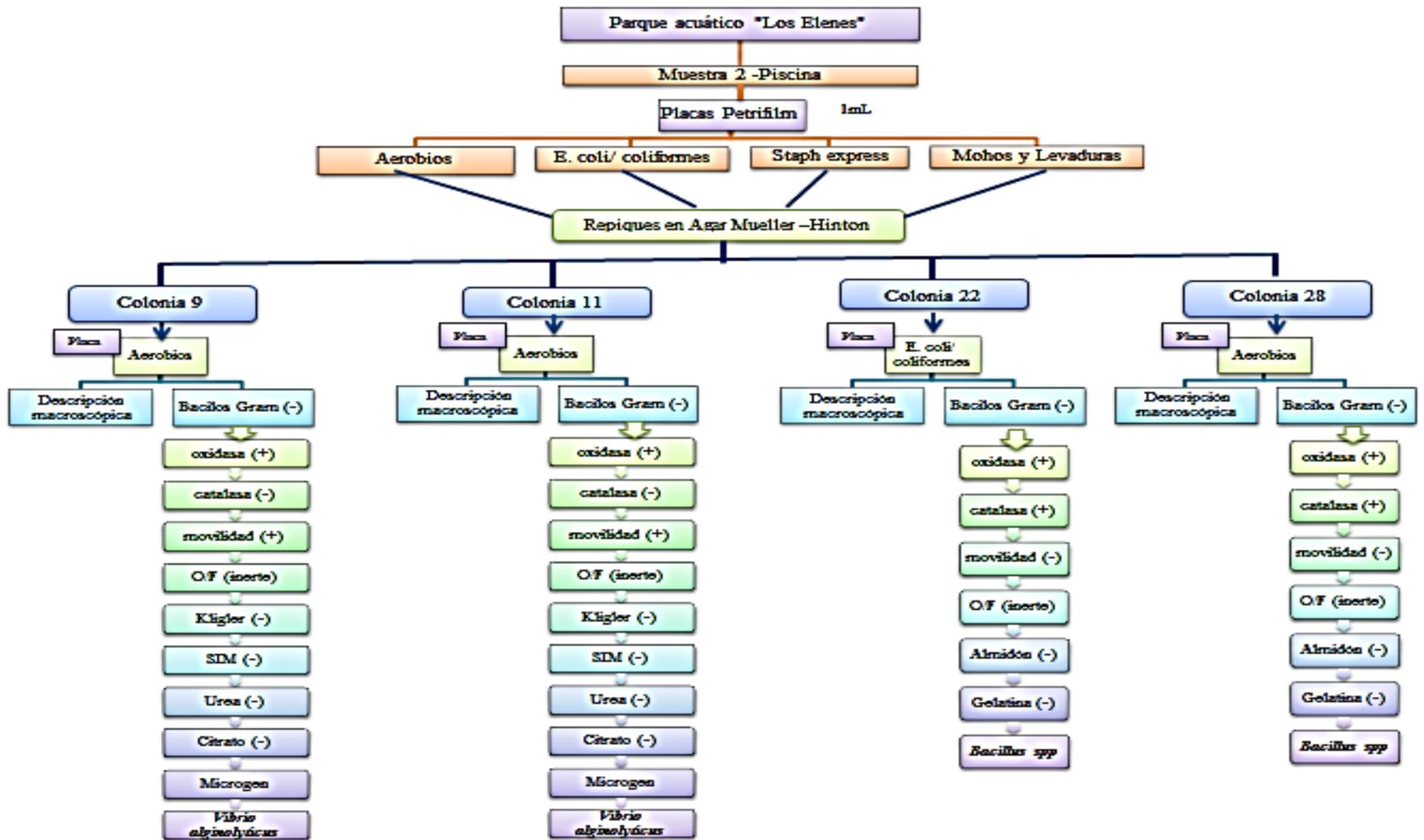
(MICROGEN: <http://www.medica-tec.com/arg/files/MICROGEN-GN-ID-MID65%20y%20MID641.pdf>).

**Imagen 2-9:** Esquema de Identificación Bacteriana de las Aguas Termomedicinales del Parque Acuático “Los Elenes” (muestra 1).



Realizado por: Evelyn Ocaña

**Imagen 2-10:** Esquema de Identificación Bacteriana de las Aguas Termomedicinales del Parque Acuático “Los Elenes” (muestra 2).



Realizado por: Evelyn Ocaña

## CAPITULO 3

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Pruebas Físico- Químicas In Situ

**Tabla 1-3:** Análisis físico- químico in situ.

PARÁMETRO	VALOR		PROMEDIO
	Ojo de Agua	Piscina	
Temperatura (°C)	21.5	21.3	21.4
pH	7.5	7.8	7.65
Sólidos totales (ppm)	1050	920	985
Conductividad (µs/cm)	1723	1845	1784
T° ambiente	16°C		

Realizado por: Evelyn Ocaña

En la tabla 1-3 se observan las pruebas físico- químicas que se realizaron a pie de manantial en las aguas termomedicinales de Los Elenes. La temperatura promedio de este afluente es 20.9°C y la temperatura ambiente es 16°C, lo que demuestra que este manantial es 5.4°C mayor a la temperatura ambiente, comprobando lo descrito por Burbano, quien define a aguas termales a las que están por encima de 4 o 5°C a la media anual del ambiente en el que se encuentran. (BURBANO, Napoleón., et al. 2013. p.10).

La temperatura de este manantial también indica que se trata de un afluente hipotermal, pues la temperatura promedio del mismo es de 21.4°C, lo que cumple con lo descrito por Burbano, que clasifica en aguas hipotermas a aquellas que se encuentran entre 20y 30°C. (BURBANO, Napoleón., et al. 2013. p.10).

Además de ello se determinó que estas aguas termales tienen un pH ligeramente básico 7.65 muy parecido a lo reportado por Burbano, quien indica un pH de 7,8. (BURBANO, Napoleón., et al. 2013. p.43). Esto debido a su composición química, como lo describe Flores, manantiales termales constituidos principalmente por iones sulfatos y sulfitos que generan ácido sulfhídrico en aguas subterráneas,

originan pH ácidos o ligeramente básicos, reportados normalmente en estudios realizados en aguas hipotermales. (FLORES, Sandra. 2013. p. 73).

Tanto el pH como la Temperatura afectan enormemente al desarrollo bacteriano. Nuñez indica que a una temperatura mínima se inhibe el crecimiento, y mientras más aumenta esta, el crecimiento también lo hace hasta encontrar una temperatura óptima de crecimiento, la que si se sobrepasa provoca la muerte del mismo. (NUÑEZ, C., et al. 2004. p.56). Por esto se puede decir que la temperatura de las aguas termales de Los Elenes es apta para que exista un crecimiento bacteriano relativamente bueno. En cuanto al pH Mandigan menciona que cada especie tiene un intervalo de pH para crecer, y la mayoría de bacterias crecen entre un pH 5.5y 8. (MANDIGAN, M., et al. 1998. p.165). Por lo mismo en este manantial pueden encontrarse una gran variedad de microorganismos.

### **3.2. Análisis Microbiológico**

En cuanto al análisis microbiológico de las aguas termales de Los Elenes, en las tablas 2-3, 3-3 y 4-3 se puede demostrar que el crecimiento bacteriano se da únicamente a nivel de la piscina y mas no del ojo de agua, el cual es relativamente aséptico, ya que al brotar dentro de una cueva está protegido de toda contaminación ambiental y humana. El hecho de que los microorganismos se desarrollen solo en la piscina da a entender que las fallas pueden estar en el sistema de tuberías que conduce el agua o quizá el agua de la misma al estar expuesta al ambiente y recibir a los bañistas es más propensa a contaminaciones.

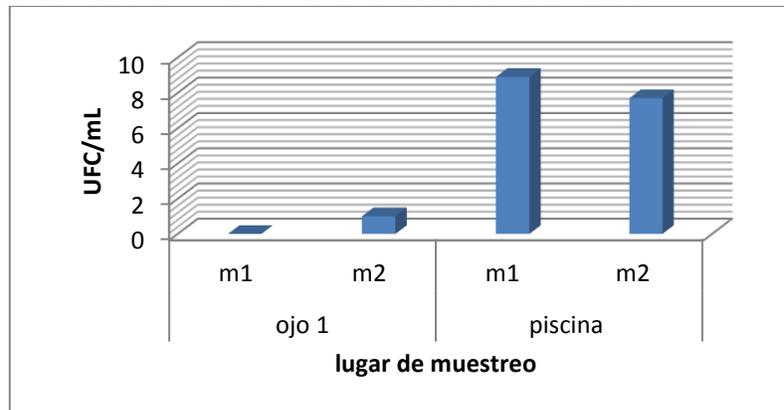
### 3.2.1. Análisis de Bacterias Aerobias Mesófilas

**Tabla 2-3:** Recuento de Bacterias Aerobias Mesófilas

SITIO DE MUESTREO		UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC/mL)	MEDIA	DESVIACION ESTÁNDAR	VARIANZA
OJO DE AGUA	M <sub>1</sub>	0	0.5	0,7071	0.5
	M <sub>2</sub>	1			
PISCINA	M <sub>1</sub>	89	83	8,4852	72
	M <sub>2</sub>	77			
TOTAL		<b>1.76X10<sup>2</sup></b>	41.75	58.3363	3403.125

Realizado por: Evelyn Ocaña

**Gráfica 1-3:** Recuento de Bacterias Aerobias Mesófilas



Realizado por: Evelyn Ocaña

La tabla 2-3 muestra que en el ojo de agua existe escaso crecimiento bacteriano, solamente se encontró 1UFC/mL, esto probablemente por su ubicación en el interior de una cueva. No sucedió lo mismo con la piscina, ya que en la misma la cantidad de bacterias aerobias mesófilas encontradas fue de 83 UFC/mL. Apella & Araujo explican que estas bacterias determinan la efectividad del tratamiento de aguas, debido a la gran sensibilidad que estas poseen a los agentes de cloración. (APELLA & ARAUJO: [www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02\\_Capitulo\\_02.pdf](http://www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02_Capitulo_02.pdf)). Es decir lo más probable es que estas bacterias estén presentes en las piscinas debido al uso inadecuado de los equipos de desinfección y a la falta de medidas de bioseguridad por parte de los encargados de la limpieza de este lugar.

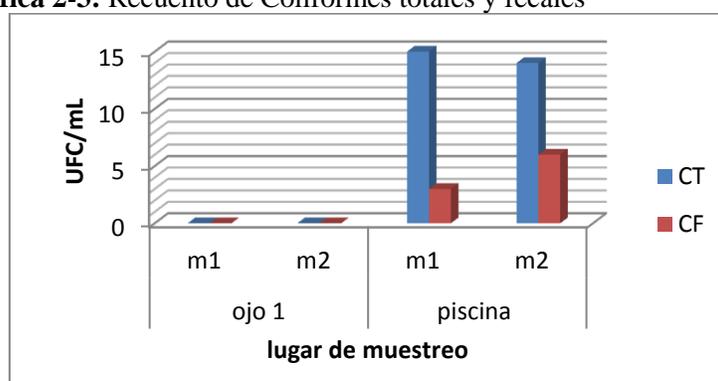
### 3.2.2. Análisis de Coliformes Totales y Fecales

**Tabla 3-3:** Recuento de Coliformes totales y fecales

SITIO DE MUESTREO		UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC/mL)			MEDIA	DESVIACION ESTÁNDAR	VARIANZA
		COL.T.	COL.F.	Total			
OJO DE AGUA	M <sub>1</sub>	0	0	0	0	0	0
	M <sub>2</sub>	0	0	0			
PISCINA	M <sub>1</sub>	15	3	18	19	1.4142	2
	M <sub>2</sub>	14	6	20			
<b>TOTAL</b>		29	9	<b>38</b>	9.5	13.4350	180.5

Realizado por: Evelyn Ocaña

**Gráfica 2-3:** Recuento de Coliformes totales y fecales



Realizado por: Evelyn Ocaña

Los resultados obtenidos demuestran claramente que el agua de la piscina es la que tiene problemas de calidad. La NCPH explica que las bacterias coliformes totales se encuentran normalmente en suelo y plantas y generalmente no causan daño, mientras que las Coliformes fecales como la *E. coli*, se encuentran en los intestinos de animales y su presencia indica contaminación fecal, por ende son consideradas patógenas e indican un alto riesgo de enfermedad. (NCPH: [http://epi.publichealth.nc.gov/oe/docs/Las\\_Bacterias\\_Coliformes\\_WellWaterFactSt.pdf](http://epi.publichealth.nc.gov/oe/docs/Las_Bacterias_Coliformes_WellWaterFactSt.pdf)).

Según esto la existencia de  $2.9 \times 10$  UFC/ml de Coliformes totales no se considera un problema real pues estas pueden provenir simplemente del suelo y plantas que rodean las piscinas del balneario. La verdadera preocupación se encuentra en la presencia de 9.0 UFC/ml de Coliformes fecales (*E. coli*), ya que lo preferible y adecuado es que exista una total ausencia de las mismas en las aguas de uso humano, lo más probable es que estas bacterias estén presentes aquí debido a que una de las tuberías lleva agua a la piscina desde un ojo de agua expuesto proveniente de una montaña, lugar en el que seguramente varios animales hacen sus necesidades las que de una u otra manera se conducen hacia esta vertiente, dejando en claro que ese ojo de agua no debería ser usado sin antes darle una adecuada protección.

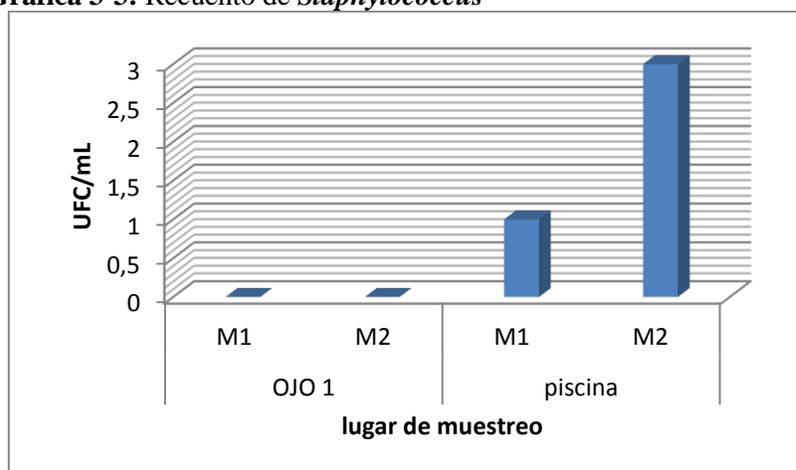
### 3.2.3. Análisis de *Staphylococcus*

**Tabla 4-3:** Recuento de *Staphylococcus*

SITIO DE MUESTREO		UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC/mL)	MEDIA	DESVIACION ESTÁNDAR	VARIANZA
OJO DE AGUA	M <sub>1</sub>	0	0	0	0
	M <sub>2</sub>	0			
PISCINA	M <sub>1</sub>	1	2	1.4142	2
	M <sub>2</sub>	3			
<b>TOTAL</b>		<b>4</b>	<b>1</b>	<b>1.4142</b>	<b>2</b>

Realizado por: Evelyn Ocaña

**Gráfica 3-3:** Recuento de *Staphylococcus*



Realizado por: Evelyn Ocaña

En cuanto a la presencia de *Staphylococcus* se puede decir que no existen un número significativo de colonias (4.0 UFC/ml), y más que eso, las pocas bacterias que crecieron en estas placas no corresponden a este género, como se demuestra en los análisis descritos posteriormente. Por ende las aguas termales de Los Elenes no presentan bacterias patógenas del genero *Staphylococcus*.

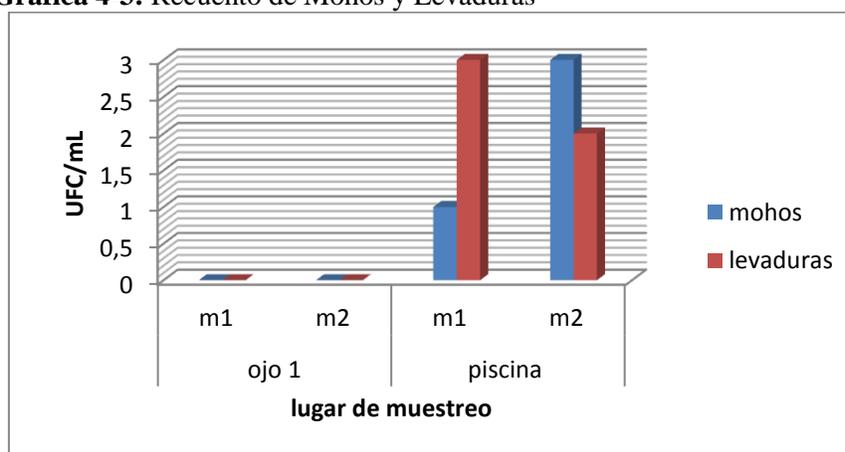
### 3.2.4. Análisis de Mohos y Levaduras

**Tabla 5-3:** Recuento de Mohos y Levaduras

SITIO DE MUESTREO		UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC/mL)			MEDIA	DESVIACION ESTÁNDAR	VARIANZA
		MOHOS	LEV.	T			
OJO DE AGUA	M <sub>1</sub>	0	0	0	0	0	0
	M <sub>2</sub>	0	0	0			
PISCINA	M <sub>1</sub>	1	3	4	4.5	0.7071	0.5
	M <sub>2</sub>	3	2	5			
TOTAL		5	5	10	4.5	0.7071	0.5

Realizado por: Evelyn Ocaña

**Gráfica 4-3:** Recuento de Mohos y Levaduras



Realizado por: Evelyn Ocaña

A pesar de que en la piscina existen 5.0 UFC/ml tanto de mohos como de levadura, Doadrio en su estudio al balneario el Raposo indica que aunque la presencia de estos microorganismos no es común en aguas termales, se han encontrado en varios manantiales, ya que la mayoría proviene del suelo, pero se adaptan a las condiciones de estos ambientes acuáticos. (DOADRIO, Antonio. 2013. p.73). Por lo tanto se puede considerar que la presencia de mohos y levaduras en estas aguas son consecuencia de alguna contaminación proveniente del suelo y de plantas que cercan el lugar.

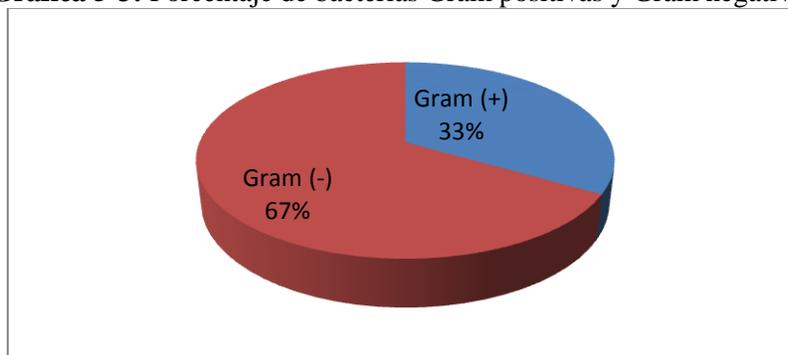
### 3.2.5. Bacterias Gram Positivas y Gram Negativas

**Tabla 6-3:** Recuento de bacterias Gram positivas y Gram negativas

SITIO DE MUESTREO		TINCION GRAM		
		GRAM (+)	GRAM (-)	TOTAL
Ojo de Agua		0	0	0
Piscina		3	6	10
PORCENTAJE %		33	67	100

Realizado por: Evelyn Ocaña

**Gráfica 5-3:** Porcentaje de bacterias Gram positivas y Gram negativas



Realizado por: Evelyn Ocaña

Al analizar la tabla 6-3 se observa que la mayor parte de cepas aisladas en las aguas termales de los Elenes corresponden a bacterias Gram negativas, 67% (6 bacterias) y muy pocas bacterias Gram positivas, 33% (3 bacterias), datos que coinciden con otros análisis realizados en varios manantiales hipotermales de España, como lo menciona Flores en su trabajo, donde cita que los manantiales hipotermales de Santa Apolonia, La Mitisús y Concepción Vilatoya tienen una población microbiana compuesta por un mayor porcentaje de bacterias Gram negativas y un menor porcentaje de Gram positivas. (FLORES, Sandra. 2013. p. 73). Demostrando que la microbiota propia de este tipo de manantiales está constituida principalmente por bacilos Gram negativos. Diferencia que se puede atribuir, como lo dijo Mosso, a que las bacterias Gram positivas poseen mayor estabilidad en altas temperaturas y por ello no son comunes en este tipo de aguas. (MOSSO, María., et al. 1999. p.439).

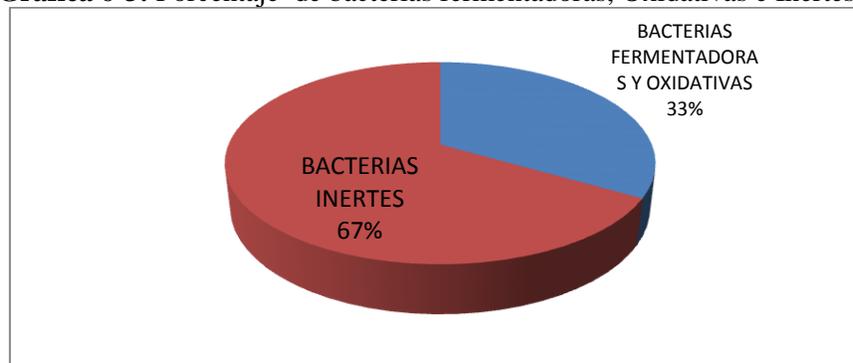
### 3.2.6. Bacterias Fermentadoras, Oxidativas e Inertes

**Tabla 7-3:** Número de bacterias fermentadoras, Oxidativas e Inertes.

SITIO DE MUESTREO	B. FERMENTADORAS Y OXIDATIVAS	B. INERTES	TOTAL
Ojo de Agua	0	0	0
Piscina	3 (Bacilos Gram negativos)	6	9
PORCENTAJE %	33	67	100

Realizado por: Evelyn Ocaña

**Gráfica 6-3:** Porcentaje de bacterias fermentadoras, Oxidativas e Inertes.



Realizado por: Evelyn Ocaña

Como se observa en la tabla 7-3 y en la gráfica 6-3 existe un 33% de bacterias fermentadoras y oxidativas que corresponden a bacilos Gram negativos, es decir que del total de bacilos Gram negativos aislados, solo la mitad corresponden a este grupo y la otra mitad más las bacterias Gram positivas aisladas corresponden a microorganismos inertes.

La Universidad Nacional de Rosario, menciona que los bacilos Gram negativos Fermentadores corresponden a *Enterobacterias*, *Vibrios* y *Aeromonas*, (UNR: <http://www.microfcmunr.com.ar/files/FilesInjuria/2014-Injuria-02B-Bacilos%20gram%20negativos%20fermentadores-Enterobacterias.pdf>), microorganismos que pueden provocar daños a la salud, pero como se ha demostrado en este estudio la mayoría de bacterias encontradas en este manantial (67%) son inertes, es decir no son nocivas para la salud e indican bajos niveles de contaminación.

### **3.2.7. Pruebas realizadas**

La tabla siguiente muestra un breve bosquejo de las pruebas bioquímicas que se realizaron a las cepas aisladas de las aguas termales de Los Elenes, a más de ello se detalla el número o código de cada bacteria, el lugar del cual provienen, las placas petrifilm en las que crecieron, sus características macroscópicas y los resultados de la tinción Gram.

**Tabla 8-3:** Descripción completa de pruebas realizadas

N°	Sitio de muestreo	Petrifilm	Descripción Macroscópica	Gram	Oxidasa	Catalasa	Movilidad	OF		Almidón	Gelatina	Pruebas Bioquímicas					
								Cerrado	Abierto			Kligler	Citrato	Urea	SIM		
															H <sub>2</sub> S	Indol	Movilidad
7	Piscina	AC	Colonias redondas, pequeñas blancas cremosas	Bacilos Gram (-)	-	-	-	+	+			acido/acido	-	-	+	+	+
9	Piscina	AC		Bacilos Gram (-)	+	-	-	-	-				alcalino/alcalino	-	-	-	-
11	Piscina	AC	Colonias ovaladas, más grandes que las anteriores, blancas cremosas	Bacilos Gram (-)	+	-	+	-	-			Alcalino/alcalino	-	-	-	-	-
15	Piscina	EC		Bacilos Gram (-)	-	-	+	+	+								
16	Piscina	EC	Colonias pequeñas algo transparentes, similares a gotas de agua.	Bacilos Gram (-)	+	-	+	-	-			alcalino/alcalino	-	-	-	-	+
20	Piscina	EC	Colonias pequeñas blanquecinas, cremosas y redondeadas	Bacilos Gram (-)	-	-	+	+	+								
19	Piscina	EC	Colonias pequeñas amarillentas y redondeadas.	Bacilos Gram (+)	+	+	-	-	-								
22	Piscina	EC	Colonias pequeñas blanquecinas, cremosas y redondeadas	Bacilos Gram (+)	-	+	-	-	-								
28	Piscina	AC	Bacilos Gram (+)	+	+	-	-	-	-								

AC: placas para Aerobios mesofilos  
 EC: placas para E.coli y coliformes

**Realizado por:** Evelyn Ocaña

Como se puede observar las 9 cepas aisladas provienen únicamente de la piscina, pues como ya se mencionó antes es donde existe el foco de contaminación, además 4 de ellas se aislaron de las placas petrifilm para *Aerobios mesófilos* y 5 de las placas para *E. coli*/ coliformes, ya que del resto de placas no se logró aislar por completo ningún microorganismo.

Entre las pruebas bioquímicas de identificación que se realizaron esta la prueba de oxidasa que como indica Fernández detecta la presencia de enzimas oxidasas. (FERNÁNDEZ, Ana., et al. 2010. p. 6). Dando como resultado que 5 de las bacterias aisladas (55.55%) tienen esta característica, y de ellas 3 corresponden a bacterias Gram negativas y 2 a bacterias Gram positivas. La prueba de Catalasa según Fernández, detecta la presencia de una enzima capaz de hidrolizar el peróxido de hidrogeno. (FERNÁNDEZ, Ana., et al. 2010. p. 6). Indicando que de las 9 bacterias aisladas, tan solo 3 (33.33%) tienen esta capacidad.

A más de estas pruebas se realizó una siembra en Agar movilidad, la cual como su nombre lo indica determina la capacidad de ciertas bacterias para moverse, pero únicamente 4 bacilos Gram negativos (44.44%) dieron como resultado positivo. La prueba de OF que sirve para determinar bacterias Fermentadoras, Oxidativas e Inertes, ya se analizó en la tabla 7-3. Recalcando que luego de la serie de pruebas mencionadas hasta aquí, se logró la identificación de las bacterias 15 y 20.

En cuanto a las pruebas de Almidón y Gelatina, que como describe Álvarez, indican la capacidad de los microorganismos para hidrolizar estas sustancias. (ÁLVAREZ, María., & BOQUET, Ernesto. 1990. p. 125). Se aplicaron únicamente a las bacterias Gram positivas ya que estas son las más propensas a poseer amabas o una de las dos capacidades, y efectivamente 3 de 3 bacterias Gram positivas, resultaron capaces de hidrolizar gelatina. Dando como resultado la identificación de las bacterias 19,22 y 28.

Por ultimo para poder continuar con la identificación de estas bacterias se realizaron otras pruebas, pero únicamente 4 de los 6 bacilos Gram negativos aislados. Según Álvarez, la prueba de Kligler determina la capacidad de una bacteria para metabolizar glucosa y lactosa; la prueba SIM la capacidad de degradar triptófano a Indol; la prueba de Citrato la capacidad de utilizar esta sustancia como única fuente de carbono y la prueba de Urea la capacidad de desdoblar esta sustancia por un proceso de alcalinización. (ÁLVAREZ, María., & BOQUET, Ernesto. 1990. p. 115). Obteniendo como resultado la identificación únicamente de la bacteria 7, optando así por realizar las pruebas Microgen a las bacterias 9,11 y 16, que poseen las mismas características y que no lograron ser identificadas luego de realizar todas las pruebas descritas.

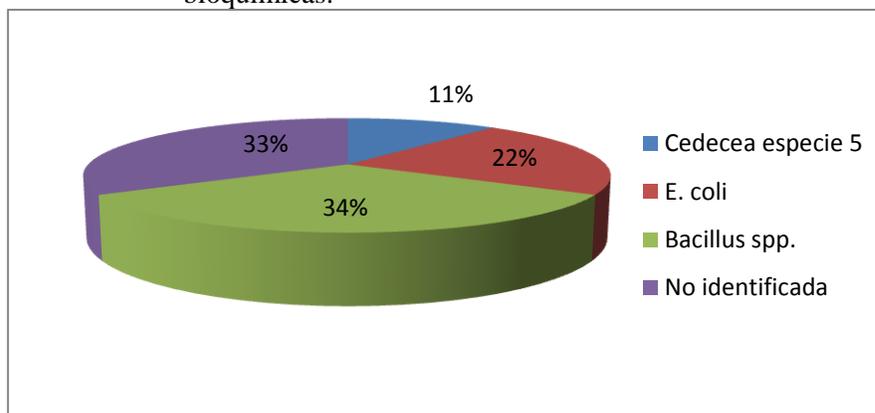
### 3.2.8. Bacterias Identificadas por Pruebas Bioquímicas

**Tabla 9-3:** Bacterias identificadas luego de realizar las pruebas descritas en la tabla 7-3.

Nº DE BACTERIA	SITIO DE MUESTREO	PETRIFILM	ESPECIE IDENTIFICADA
7	Piscina	AC	<i>Cedecea especie 5</i>
9	Piscina	AC	No identificada
11	Piscina	AC	No identificada
15	Piscina	EC	<i>E. coli</i>
16	Piscina	EC	No identificada
20	Piscina	EC	<i>E. coli</i>
19	Piscina	EC	<i>Bacillus spp.</i>
22	Piscina	EC	<i>Bacillus spp.</i>
28	Piscina	AC	<i>Bacillus spp.</i>
<b>TOTAL</b>			9
<b>PORCENTAJE %</b>			100

Realizado por: Evelyn Ocaña

**Gráfica 7-3:** Porcentaje de Bacterias identificadas luego de realizar las pruebas bioquímicas.



Realizado por: Evelyn Ocaña

Después de la realización de las pruebas descritas en la tabla 8-3, se lograron identificar 6 de las 9 cepas aisladas en las aguas de este manantial. La tabla 9-3 muestra los nombres de dichas bacterias. La bacteria 7 corresponde a una *Cedecceea especie 5*, que como indica Salazar, pertenece a la familia de las *Enterobacteriaceae*, se trata de bacilos Gram negativos, oxidasa negativos y sin motilidad, (SALAZAR, Grace., et al. 2012. p.87), características que definitivamente coinciden con los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas. A más de ello Koneman, describe que estas cepas son bacterias patógenas no muy frecuentes, pero encontradas comúnmente en heridas de pies. (KONEMAN, Elmer. 2006. p.264), lo que sin lugar a dudas podría dar a entender que si la *Cedecceea especie 5* está presente en las aguas

termales de Los Elenes debe ser porque en algún momento existió algún bañista portador de la misma, y que al meterse a bañar en la piscina, disperso el microorganismo por el lugar.

Las bacterias 15 y 20 dieron como resultado *Echerichia coli*, una bacteria que como describe Arcos corresponde a bacilos Gram negativo, oxidasa negativos, movilidad positiva y fermentadores en medio OF. (ARCOS, Mireya., et al. 2005. p. 72). Características iguales a las descritas en las pruebas bioquímicas realizadas en este análisis. Además y como ya se mencionó anteriormente esta bacteria es indicador de contaminación fecal y puede estar presente en la piscina debido a que una de las tuberías que lleva agua hacia la misma proviene de un ojo de agua expuesto en una montaña y no cuenta con protección alguna.

Las cepas 19,22 y 28 corresponden a bacterias del género *Bacillus spp.* las cuales según Cuervo son bacilos Gram positivos, catalasas positivos y fermentadores de almidón o gelatina. (CUERVO, Jenny. 2010. p.7). Características similares a las reportadas en este estudio, tomando en cuenta que además de ello la Biblioteca Virtual de Desarrollo Sostenible y Salud ambiental indica que los *Bacillus* se detectan comúnmente en agua, incluso en aquella que han sido tratada previo consumo, debido a sus esporas altamente resistentes a procesos de desinfección. (BVSDE: [http://www.bvsde.paho.org/cd-gdwq/docs\\_microbiologicos/Bacterias%20PDF/Bacillus.pdf](http://www.bvsde.paho.org/cd-gdwq/docs_microbiologicos/Bacterias%20PDF/Bacillus.pdf)).

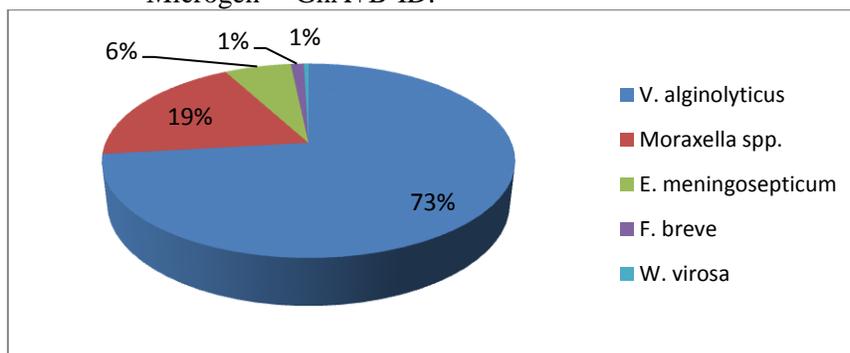
### 3.2.9. Bacterias identificadas por Sistema Microgen

**Tabla 10-3:** Bacterias identificadas por sistema Microgen™ GnA+B-ID

Nº DE BACTERIA	MUESTREO	PETRIFILM	ESP. IDENTIFICADA
9	Piscina	AC	<i>Vibrio alginolyticus</i>
11	Piscina	AC	
16	Piscina	EC	
<b>TOTAL</b>			3
<b>PORCENTAJE %</b>			100

Realizado por: Evelyn Ocaña

**Gráfica 8-3:** Porcentaje de probabilidad de bacterias identificadas por sistema Microgen™ GnA+B-ID.



Realizado por: Evelyn Ocaña

Como se muestra en la gráfica 8-3, el sistema Microgen genera un informe de los cinco microorganismos más parecidos en una base de datos selectiva, donde la cepa con mayor porcentaje de probabilidad es la que corresponde a la bacteria que se está tratando de identificar.

Las muestras analizadas para este test (9,11 y 16) según la pruebas bioquímicas realizadas hasta el momento poseían las mismas características, por lo que se eligió solamente a una de ellas (9) para realizar este test, dando como resultado una *Vibrio alginolyticus*, microorganismo que como indica Gutiérrez es un bacilo Gram negativo perteneciente al género *Vibrio*, oxidasa positiva, reductora de nitratos, y positiva para licuefacción de gelatina. A más de ello se describe que este microorganismo se aísla de aguas saladas y de alimentos de origen marino o contaminados con agua de mar. (GUTIÉRREZ & GARCÍA: <http://www.revistaaquatic.com/aquatic/art.asp?c=22>). De la Rosa indica también que la presencia de bacterias halófilas moderadas como *Vibrio* es frecuente en manantiales hipertónicos y con menor temperatura. (DE LA ROSA, María. 2000. p. 156). Lo que nos da a entender perfectamente que lo más probable es que dicha bacteria está presente en estas aguas termales debido a su elevado contenido de sales minerales ( $SO_4^{=}$ : 699.5,  $Mg^{++}$ : 126.9; agua sulfatada magnésica), y a su temperatura hipotermal de 21.4°C.

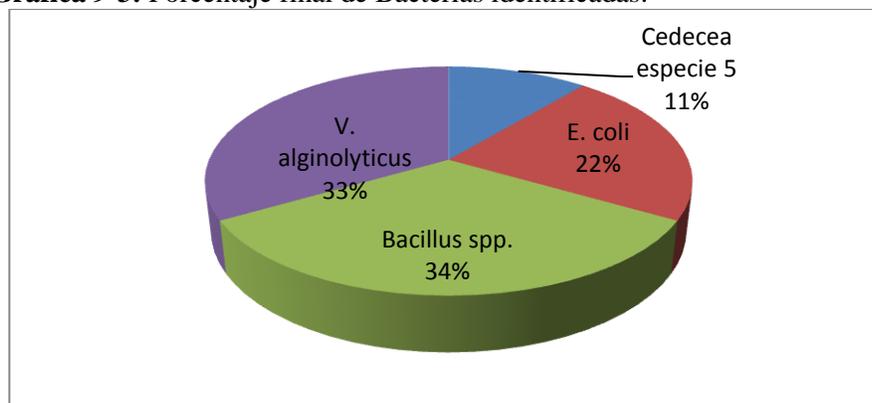
### 3.2.9. Total de Bacterias Identificadas

**Tabla 11-3:** Total de bacterias identificadas según el sitio de muestreo y la placa petrifilm de origen.

Nº DE BACTERIA	SITIO DE MUESTREO	PETRIFILM	GRAM	ESPECIE INDENTIFICADA
7	Piscina	AC	Bacilos Gram (-)	<i>Cedecea especie 5</i>
9	Piscina	AC	Bacilos Gram (-)	<i>Vibrio alginolyticus</i>
11	Piscina	AC	Bacilos Gram (-)	<i>Vibrio alginolyticus</i>
15	Piscina	EC	Bacilos Gram (-)	<i>E. coli</i>
16	Piscina	EC	Bacilos Gram (-)	<i>Vibrio alginolyticus</i>
20	Piscina	EC	Bacilos Gram (-)	<i>E. coli</i>
19	Piscina	EC	Bacilos Gram (+)	<i>Bacillus spp.</i>
22	Piscina	EC	Bacilos Gram (+)	<i>Bacillus spp.</i>
28	Piscina	AC	Bacilos Gram (+)	<i>Bacillus spp.</i>
<b>TOTAL</b>				9
<b>PORCENTAJE %</b>				100

Realizado por: Evelyn Ocaña

**Gráfica 9-3:** Porcentaje final de Bacterias identificadas.



Realizado por: Evelyn Ocaña

En la tabla 11-3 se detallan los organismos identificados en esta agua, predominando los *Bacillus spp* con un 34%, género que corresponde al porcentaje total de bacilos Gram positivos hallados en la investigación (33%).

En cuanto a los bacilos Gram negativos (67%), el género predominante corresponde a *V. alginolyticus* con un 33%, seguido de *E. coli* con un 22% y por ultimo esta la *Cedecea especie 5* con apenas un 11%. Diversidad de bacterias que corresponden a los microorganismos de interés sanitario y que por ende muestran falencias en la calidad sanitaria de las Aguas Termomedicinales de los Elenes, lo que constituye un riesgo para los bañistas que acuden asiduamente a este lugar.

## CONCLUSIONES

- Se determinó los parámetros físico –químicos in situ, comprobando que las Aguas Termomedicinales de los Elenes corresponden a la clase de aguas hipotermales y ligeramente básicas.
- Se aislaron un total de 9 colonias bacterianas, de las cuales un 33% corresponden a bacterias Gram positivas y un 67% a bacterias Gram negativas, es decir estas aguas están constituidos principalmente por bacilos de este tipo.
- Utilizando pruebas bioquímicas, se logró identificar a nivel de género las tres colonias de bacterias Gram positivas y a nivel de género y especie tres colonias de las 6 bacterias Gram negativas aisladas.
- Empleando el sistema de identificación bioquímica Microgen™ GN- ID A+B, Se identificaron a nivel de género y especie tres colonias de las bacterias Gram negativas aisladas de este manantial termal.
- El género de bacterias Gram positivas encontradas en estas aguas corresponde a *Bacillus* spp., mientras que de las bacterias Gram negativas aisladas los géneros encontrados fueron el género *Enterobacteriaceae*, con especies *Escherichia coli* y *Cedecea* especie 5, y el género *Vibrio*, con especie *Vibrio alginolyticus*.
- Se determinó que las especies *Vibrio alginolyticus*, *Escherichia coli* y *Cedecea* especie 5 encontrados con alta frecuencia en estas aguas, constituyen microorganismos patógenos de interés sanitario indicadores de posibles contaminaciones humanas y ambientales.

## RECOMENDACIONES

- Continuar con este análisis microbiológico para lograr identificar completamente las especies que se encuentran en estas aguas, e implementar también un análisis de los microorganismos de interés ecológico que existen en este manantial.
- A futuro se pueden realizar análisis moleculares que permitan corroborar la identidad de las especies aisladas.
- Desarrollar trabajos que permitan determinar si en este lugar existen microorganismos con especies antibacterianas y antifúngicas o quizá con actividades amiolíticas y proteolíticas.
- Es necesario capacitar en cuanto a normas de asepsia y calidad a todos quienes administran los balnearios de aguas termales del país para prevenir posibles contaminaciones.
- En vista de que el Ecuador es un país rico en manantiales termales usados por miles de bañistas, se debería crear una legislación que regule el funcionamiento de estas aguas para garantizar la salud e inocuidad de sus usuarios.
- Socializar y capacitar a los encargados del Parque Acuático Los Elenes, con ello garantizaremos que este análisis sirva para tomar medidas correctivas y para mejorar la calidad sanitaria de este lugar turístico.

## **BIBLIOGRAFÍA**

**AGUILERA, Lourdes., et al.** Estudio de las Aguas Minero- Medicinales de los establecimientos balnearios del Maresme: “Caldes D’ Estrac” y “Titus”. *Revista Real Academia Medica Catalunya*. Vol. 9(1). 1994. Madrid-España. pp. 31-38.

**AGUAS MINEROMEDICINALES.** Termared. 2010.

[http://www.termared.com/docs/repositorio/es\\_ES/investigacion/aguasmineromedicinales.pdf](http://www.termared.com/docs/repositorio/es_ES/investigacion/aguasmineromedicinales.pdf)

Fecha de consulta: 2014/10/05.

**AGUAS TERMALES, MINERALES Y NATURALES DE MANANTIAL EN EL ECUADOR.**

Paladines, A. 2011.

<http://www.geologiaecuador.com/2011/04/aguas-termales-minerales-y-naturales-de.html>

Fecha de consulta: 2014/10/01.

**ÁLVAREZ, María., & BOQUET, Ernesto.** Manual de Técnicas en Microbiología Clínica. 2ª ed. Madrid-España. Garsi. 1990. pp. 29-39, 111-144.

**ARCOS, Mireya., et al.** Indicadores microbiológicos de contaminación del agua. *NOVA*. Vol.3 (4). 2005. Madrid-España. pp. 72-74.

**ARGENTINA.** Universidad Tecnológica Nacional. Tinción y observación de microorganismos. Trabajo Practico 4. Buenos Aires-Argentina. 2009. pp.4-5.

**BACILLUS.** BVSDE. 2010.

[http://www.bvsde.paho.org/cd-gdwq/docs\\_microbiologicos/Bacterias%20PDF/Bacillus.pdf](http://www.bvsde.paho.org/cd-gdwq/docs_microbiologicos/Bacterias%20PDF/Bacillus.pdf)

Fecha de consulta: 2014/05/05.

**BAILÓN., Lucía., et al.** Atlas de Pruebas Bioquímicas para Identificar Bacterias. México D.F.-México. Universidad Autónoma de México. 2003. pp.16-23.

**BARROW. G., & FELTHAM. R.** Cowan and steel’s manual for identification of medical bacteria. 3ª ed. Cambridge-Inglaterra. Cambridge University Press. 2003. pp. 123, 130, 198-200.

**BURBANO, Napoleón., et al.** Aguas Termominerales en el Ecuador. Quito- Ecuador. INAMHI. 2013. pp. 5-13, 40-43.

**CANTÓN GUANO.** Asociación de Municipalidades Ecuatorianas. 2012.

<http://www.ame.gob.ec/ame/index.php/ley-de-transparencia/65-mapa-cantones-del-ecuador/mapa-chimborazo/263-canton-guano>

Fecha de consulta: 2014/10/ 10.

**CAMPOVERDE T., María J., & GONZALES M., Fanny E.** Determinación de Mohos y Levaduras del sistema de agua de la Junta Administradora de Agua Potable de la parroquia Baños. (Tesis). BQF. Universidad de Cuenca, facultad de Ciencias Químicas, Escuela de Bioquímica y Farmacia. 2012. p.47.

**CHAN, Luis.** Reseña de “Metodología de la investigación” de Hernández, R.; Fernández, C. y Baptista, P. *Persona*. Vol.7 (1). 2004. Lima-Peru. pp. 168-169.

**CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE.** *M100-S24* Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. *Twenty-Fourth Informational Supplement*. Vol. 34(1). 2014. Estados Unidos. pp. 11-18.

**CONCEPTOS BÁSICOS SOBRE RADIATIVIDAD.** Nonuclear. 2005.

[http://www.nonuclear.org.ar/sitio/archivo\\_informes/conceptos\\_basicos\\_sobre\\_radiac.pdf](http://www.nonuclear.org.ar/sitio/archivo_informes/conceptos_basicos_sobre_radiac.pdf)

Fecha de consulta: 2014/10/10.

**CUERVO L., Jeanny. P.** Aislamiento y caracterización de *Bacillus spp* como fijadores biológicos de nitrógeno y solubilizadores de fosfatos en dos muestras de biofertilizantes comerciales. (Tesis). Microbiólogo Agrícola y Veterinario. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencia Básicas, Carrera de Microbiología Agrícola y Veterinaria. Bogotá-Colombia. 2010. p.7.

**DE LA ROSA, María., & MOSSO, María.** Diversidad Microbiana de las Aguas Minerales Termales. Panorama actual de las Aguas Minerales y Minero- medicinales en España. Madrid-España. Instituto Tecnológico Geominero de España. 2000. pp.153- 157.

**DE LA ROSA, Manuel., et al.** Microbiología en Ciencias de la salud: Conceptos y aplicaciones. 3ª ed. Madrid-España. Elseiver. 2011. pp.1-5.

**DOADRIO, Antonio.** Balnearios de España, Aguas Minerales y Minero medicinales. *Real Academia Nacional de Farmacia*. Vol. 11. 2013. Madrid-España. pp. 67-78.

**ECUADOR.** Instituto Ecuatoriano de Normalización. Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1105:1983. Aguas. Muestreo para examen microbiológico. Quito-Ecuador. 2012. pp. 1-3.

**ECUADOR.** Instituto Ecuatoriano de Normalización. Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 2169:2013. Agua. Calidad del agua. Muestreo. Manejo y conservación de muestras. Quito-Ecuador. 2013. pp. 1-3.

**ECUADOR.** Instituto Ecuatoriano de Normalización. Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 2176:2013. Agua. Calidad del agua. Muestreo. Técnicas de muestreo. Quito-Ecuador. 2013. pp. 1-3.

**FAO/OMS.** Norma Codex para las Aguas Minerales Naturales. Codex Standard 108-1981. Enmienda 201. 2008. pp. 1.

**FERNÁNDEZ, Ana., et al.** Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio. *Procedimientos en Microbiología Clínica*. Vol. 37. 2010. Madrid-España. pp. 6-7.

**FLORES, Sandra.** Aislamiento, identificación y detección de microorganismos con actividades biológicas, procedentes de las aguas de los manantiales termales La Mitisús y santa Apolonia del estado de Mérida. (Tesis). Maestría. Universidad de los Andes, Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Postgrado en Química de Medicamentos. 2013. pp. 71-97.

**KONEMAN, Elmer., & ALLEN, Stephen.** Diagnóstico Microbiológico. 6ª ed. Madrid-España. Editorial Médica Panamericana. 2006. p.264.

**LAGARTO, Alicia., & BERNAL, Ingrid.** Utilización Terapéutica de las Aguas y Fangos Mineromedicinales. *Revista Cubana de Farmacia*. Vol. 36(1). 2002. La Habana-Cuba. pp. 62-68.

**LLAMAS DEL AGUA, Mar.** Las aguas minero- medicinales del Balneario de Almeida. *Medicina Naturista*. Vol. 3 (1). 2009. Almeida-España. pp. 47-60.

**LÓPEZ, J., & PINUAGA, J.** Panorama actual de las Aguas Minerales y Minero- medicinales en España. Madrid- España. Instituto Tecnológico Geominero de España. 2000. p. 153.

**MACFADDIN, Jean.** Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de Importancia Clínica. 3ª ed. Montevideo-Uruguay. Editorial Médica Panamericana. 2000. pp. 723-733.

**MADIGAN, Michael., et al.** Biología de los Microorganismos. 8ª ed. Madrid-España. Prentice Hall. 1998. pp. 162-981.

**MICROBIOLOGÍA DEL AGUA. CONCEPTOS BÁSICOS.** Apella & Araujo. 2010.

[https://www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02\\_Capitulo\\_02.pdf](https://www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02_Capitulo_02.pdf)

Fecha de consulta: 2015/03/04.

**MICROGEN™ BIOCHEMICAL ID.** Microgen Bioproducts Ltd. 2003.

<http://www.microgenbioproducts.com/bacteriology.htm>

Fecha de consulta: 2015/05/15.

**MOLTÓ, Lucía.** (1992). Tipos de aguas minero-medicinales en yacimientos arqueológicos de la península Ibérica. *Espacio, Tiempo y Forma*. Serie II. 1992. Madrid-España. pp. 211- 228.

**MORFOLOGÍA DE LAS COLONIAS BACTERIANAS.** Microdonto. 2009.

<http://microdonto.files.wordpress.com/2009/03/morfologia-de-las-colonias-bacterianas.pdf>

Fecha de consulta: 201412/07.

**MOURELLE, María.** Aspectos Físicos y Químicos del Termalismo. *Real Academia de Medicina y Cirugía de Galicia*. Sesión Académica Extraordinaria sobre el Termalismo. Documentación extraordinaria. 2007. Madrid-España. pp. 8-23.

**NUÑES, Claudia., et al.** La vida a altas temperaturas. *Revista de la Academia Mexicana de Ciencias*. Vol. 55(1). 2004. México D.F.-México. pp. 56-65.

**PARQUE ACUÁTICO LOS ELENES.** Municipio de Guano. 2010.

<http://www.municipiodeguano.gob.ec/ot/index.php/sample-sites/shop/lugares/133-parque-acuatico-los-elenes>

Fecha de consulta: 2014/10/ 10.

**PROPIEDADES Y FUNCIONES BIOLÓGICAS DEL AGUA.** Carvajal & González. 2012.

<https://www.ucm.es/data/cont/docs/458-2013-07-24-Carvajal-Gonzalez-2012-ISBN-978-84-00-09572-7.pdf>

Fecha de consulta: 2015/01/05.

**PROTÉJASE DE LAS BACTERIAS COLIFORMES EN EL AGUA DE SU POZO.** North Carolina Public Health. 2009.

[http://epi.publichealth.nc.gov/oeo/docs/Las\\_Bacterias\\_Coliformes\\_WellWaterFactSt.pdf](http://epi.publichealth.nc.gov/oeo/docs/Las_Bacterias_Coliformes_WellWaterFactSt.pdf)

Fecha de consulta: 2015/05/15.

**RECUESTO DE MOHOS Y LEVADURAS. GUÍA DE INTERPRETACIÓN PETRIFILM™.**

Microbiology Products Laboratoires 3M. 2009.

[http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat.workshopmrama/files/Petrifilm\\_guias.pdf](http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat.workshopmrama/files/Petrifilm_guias.pdf)

Fecha de consulta: 2015/01/05.

**RECUESTO DE AEROBIOS. GUÍA DE INTERPRETACIÓN PETRIFILM™.** Microbiology

Products Laboratoires 3M. 2009.

[http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat.workshopmrama/files/Petrifilm\\_guias.pdf](http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat.workshopmrama/files/Petrifilm_guias.pdf)

Fecha de consulta: 2015/01/05.

**RECUESTO DE E. COLI/COLIFORMES. GUÍA DE INTERPRETACION. GUÍA DE INTERPRETACIÓN PETRIFILM™.** Microbiology Products Laboratoires 3M. 2009.

[http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat.workshopmrama/files/Petrifilm\\_guias.pdf](http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat.workshopmrama/files/Petrifilm_guias.pdf)

Fecha de consulta: 2015/01/05.

**RODÉS, Benito.** Control de Calidad de las Aguas Minero- Medicinales. Panorama actual de las Aguas Minerales y Minero- medicinales en España. Madrid-España. Instituto Tecnológico Geominero de España. 2000. pp.72- 86.

**SISTEMA DE RECuento STAPH EXPRESS. GUÍA DE INTERPRETACIÓN PETRIFILM™.** Microbiology Products Laboratoires 3M. 2009.

[http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat.workshopmrama/files/Petrifilm\\_guias.pdf](http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat.workshopmrama/files/Petrifilm_guias.pdf)

Fecha de consulta: 2015/01/05.

**SAN JOSÉ, Juan.** Aguas Mineromedicinales Argentinas. *Balnea*. Número 4. 2008. Buenos Aires-Argentina. pp.13-34.

**SÁNCHEZ, María., et al.** Microbiología de las aguas mineromedicinales de los Balnearios de Jaraba. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*. Vol. 4 (extra 1). 2004. Jaraba-España. pp.521-541.

**SALAZAR, Grace., et al.** Infección de herida traumática por *Cedecea lapagei*. Comunicación de un caso y revisión de literatura. *Scielo*. Vol. 30(1). 2013. Santiago-Chile. p.86.

**SUÁREZ, Maritza.** Consideraciones sobre el control sanitario de los fangos medicinales o peloides. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*. Vol. 44(3). 2006. La Habana-Cuba. p.53.

**VENDRELL, M., et al.** Estudio de microorganismos patógenos en la fuente termal de O Tinteiro en Ourense. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*. Vol. 2(2). México D.F.-México. pp. 92-95.

**VENEZUELA.** Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". *Plantillas sugeridas para el antibiograma estandarizado*. Caracas-Venezuela. 2014. pp. 2-5.

**VENEZUELA.** Universidad Central de Venezuela. Morfología y Tinción de los Microorganismos. Trabajo Practico 6. Caracas-Venezuela. 2008. pp.2-3.

**VIBRIOS DE ORIGEN MARINO EN PATOLOGÍA HUMANA.** Gutiérrez & García. 1993.

<http://www.revistaaquatic.com/aquatic/art.asp?c=22>

Fecha de consulta: 2015/05/20.

**TORELLA, Francisco.** La sulfuraria de Baños de Montemayor (Cáceres): características morfológicas y funcionales de la comunidad microbiana constituyente. *Anales de Hidrología Médica*. Vol.1. 2006. Madrid-España. pp. 61-78.

**ZAVALA, Ariana.** La vida oscura de *Vibrio Alginolyticus*. *Revista Digital Universitaria*. Vol.6 (4). 10 de abril del 2005. México D.F.-México. p.5.

## ANEXOS

### Anexo A: Parque Acuático “Los Elenes”



Realizado por: Evelyn Ocaña

### Anexo B: Sitio de Muestreo – Piscina



Realizado por: Evelyn Ocaña

### Anexo C: Sitio de Muestreo – Ojo de Agua



Realizado por: Evelyn Ocaña

**Anexo D: Toma de Muestras**



**Realizado por:** Evelyn Ocaña

**Anexo E: Medición de parámetros físico-químicos in Situ.**



**Realizado por:** Evelyn Ocaña

**Anexo F: Placas Petrifilm y Dispersores**



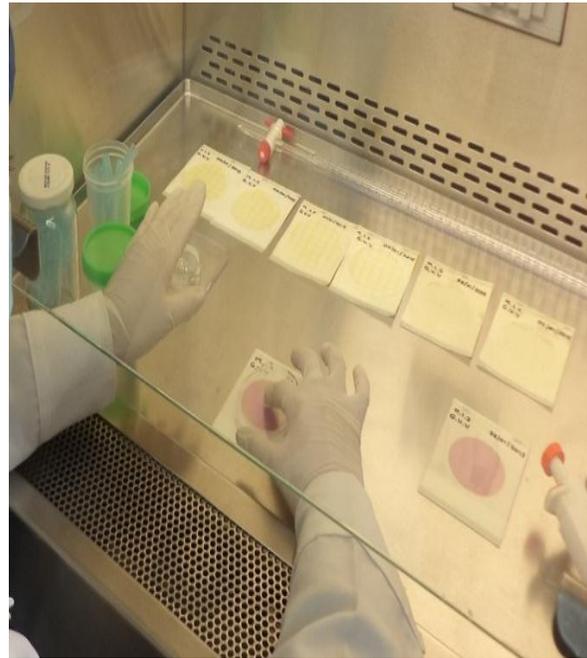
**Realizado por:** Evelyn Ocaña

**Anexo G: Siembra en Placas Petrifilm**



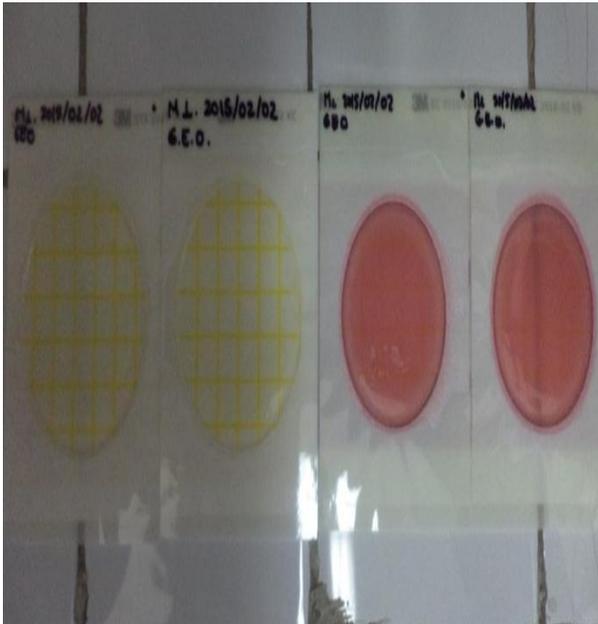
**Realizado por:** Evelyn Ocaña

**Anexo H: Uso del dispensador de muestras**



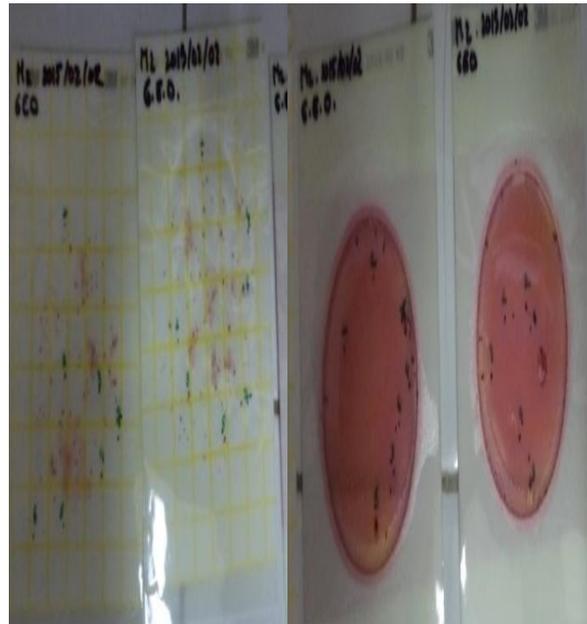
**Realizado por:** Evelyn Ocaña

**Anexo I: Resultado del Muestreo- Ojo de Agua**



**Realizado por:** Evelyn Ocaña

**Anexo J: Resultado del Muestreo – Piscina**



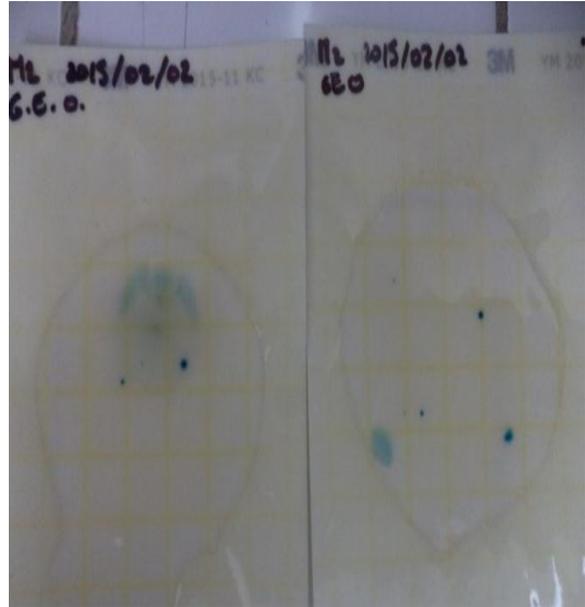
**Realizado por:** Evelyn Ocaña

**Anexo K: Resultado Mohos y Levaduras-  
Muestra 1**



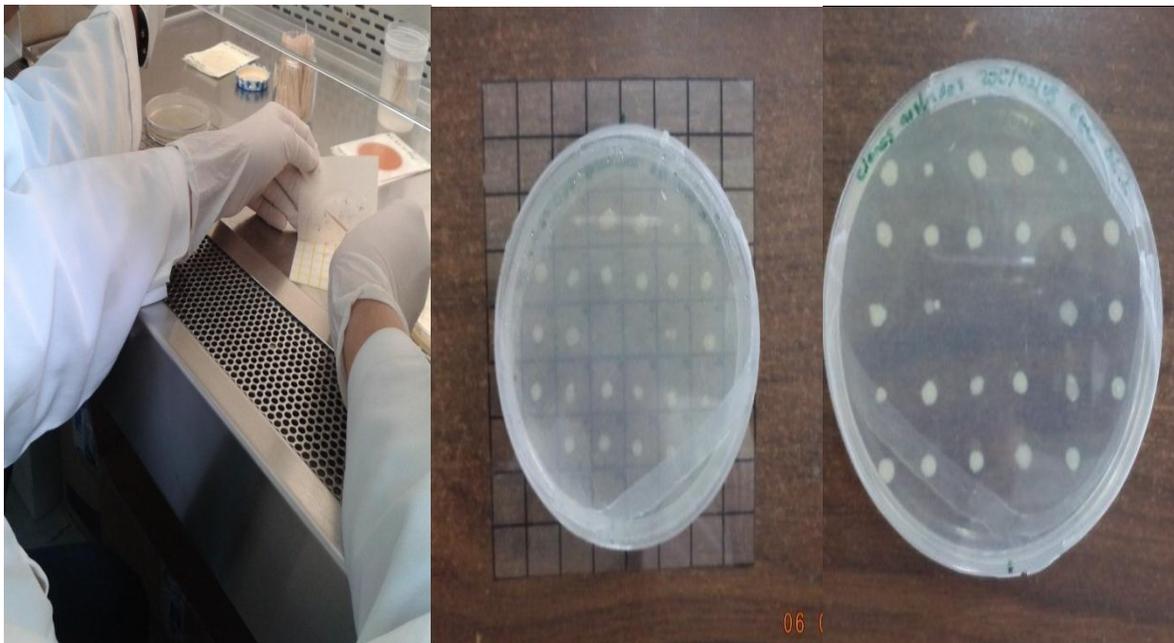
Realizado por: Evelyn Ocaña

**Anexo L: Resultado Mohos y Levaduras-  
Muestra 2**



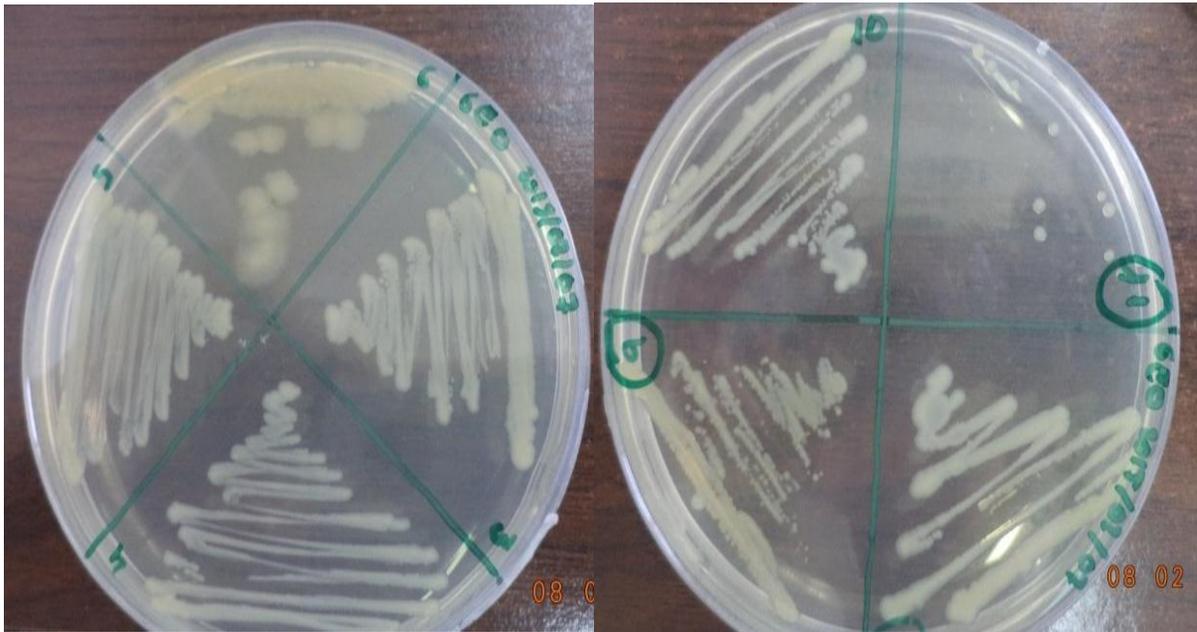
Realizado por: Evelyn Ocaña

**Anexo M: Repiques de colonias en Agar Mueller Hinton**



Realizado por: Evelyn Ocaña

**Anexo N:** Siembra en estría de las colonias aisladas



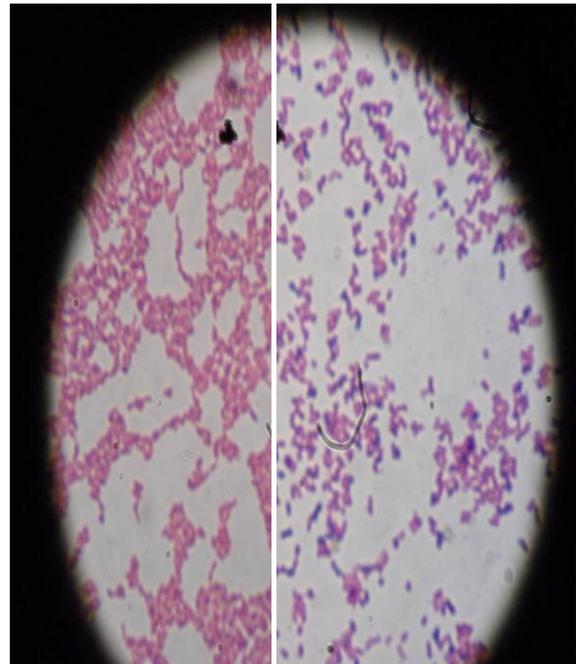
Realizado por: Evelyn Ocaña

**Anexo O:** Realización de la Tinción Gram



Realizado por: Evelyn Ocaña

**Anexo P:** Resultado de la Tinción- Bacilos Gram Positivos y Bacilos Gram Negativos



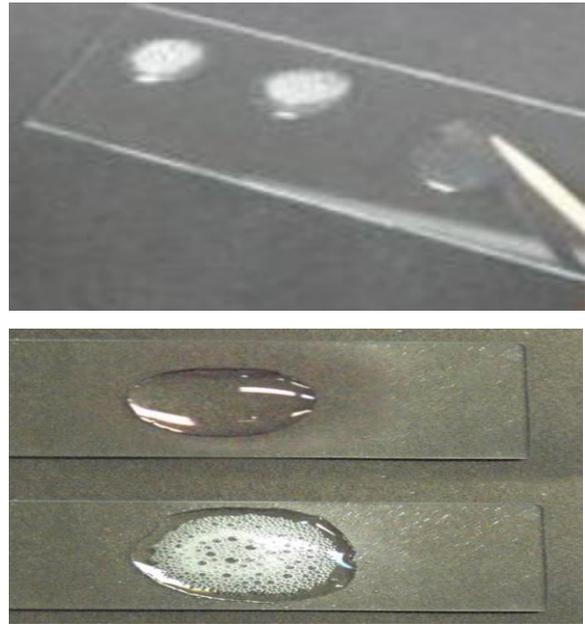
Realizado por: Evelyn Ocaña

**Anexo Q: Prueba de Oxidasa**



Realizado por: Evelyn Ocaña

**Anexo R: Prueba de Catalasa**



Realizado por: Evelyn Ocaña

**Anexo S: Prueba de movilidad**



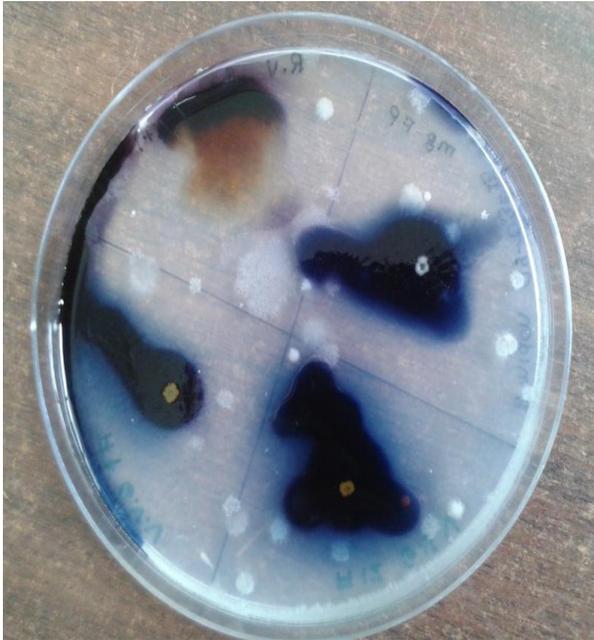
Realizado por: Evelyn Ocaña

**Anexo T: Prueba de Oxido- Fermentación**



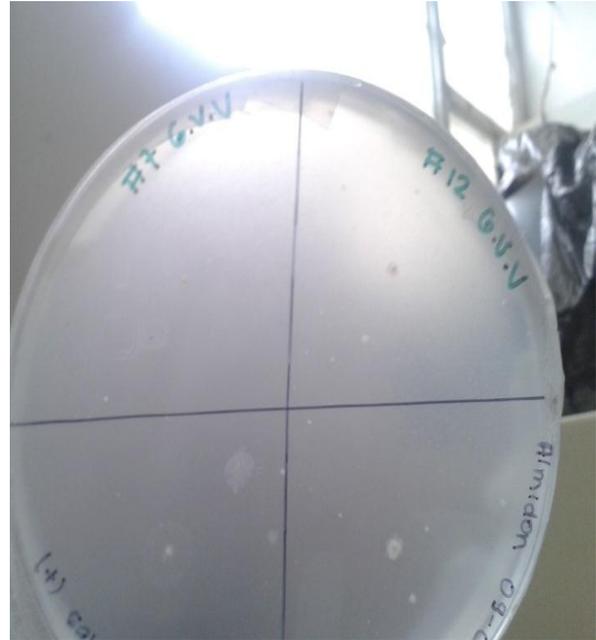
Realizado por: Evelyn Ocaña

**Anexo U:** Prueba de Almidón para Bacilos Gram Positivos



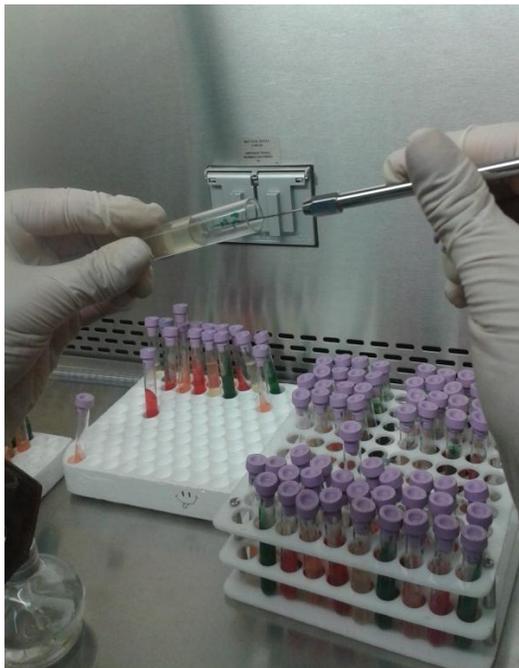
Realizado por: Evelyn Ocaña

**Anexo V:** Prueba de Gelatina para Bacilos Gram Positivos



Realizado por: Evelyn Ocaña

**Anexo W :** Pruebas Kligler, Citrato, Urea y SIM para Bacilos Gram negativos



Realizado por: Evelyn Ocaña



## Anexo X: Uso del Sistema de Identificación Bioquímica Microgen



Realizado por: Evelyn Ocaña

## Anexo Y: Reporte de las pruebas de Identificación Bioquímica Microgen

**GN-ID A+B PANEL REPORT FORM**

Lab. No. \_\_\_\_\_ Specimen Type: \_\_\_\_\_  
 Date: 2015/05/09

Well Number	GN A wells												GN B wells															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24				
Reaction	Oxidase	Motility	Nitrate	Lysine	Ornithine	H <sub>2</sub> S	Glucose	Mannitol	Xylose	ONPG	Indole	Urease	V.P.	Citrate	TDA	Gelatine	Malonate	Inositol	Sorbitol	Rhamnose	Sucrose	Lactose	Arabinose	Adonitol	Raffinose	Salicin	Arginine	
Result	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Reaction Index	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4
Sum of Positive Reactions	5			4			0			0			5			4			0			0			0			

Octal Code: \_\_\_\_\_ Final Identification: \_\_\_\_\_

Realizado por: Evelyn Ocaña

**Microgen GNA + B Oxidase Positive**

**Specimen Details**

Lab Ref.: GE9  
 Name: Evelyn Ocaña  
 Specimen Type:  
 Source (ward/location):

Date:

**Results Entry**

Octal Code: 500454000

+ OXI	Oxidase	- MOT	Motility	+ NIT	Nitrate Reduction
- LYS	Lysine Decarboxylase	- ORN	Ornithine Decarboxyl	- H2S	H2S Production
- GLU	Acid from Glucose	- MAN	Acid from Mannitol	- XYL	Acid from Xylose
+ ONP	ONPG	- IND	Indole	- UR	Urea Hydrolysis
+ VP	Voges Proskauer	- CIT	Citrate Utilization	+ TDA	Tryptophan Deaminase
+ GEL	Gelatin Liquefaction	- MAL	Malonate Inhibition	- INO	Acid from Inositol
- SOR	Acid from Sorbitol	- RHA	Acid from Rhamnose	- SUC	Acid from Sucrose
- LAC	Acid from Lactose	- ARA	Acid from Arabinose	- ADO	Acid from Adonitol
- RAF	Acid from Raffinose	- SAL	Acid from Salicin	- ARG	Arginine Dihydrolase

**Identification Analysis**

Select ID Choice	<i>V.alginolyticus</i>	<i>Moraxella spp.</i>	<i>E.meningosepticum</i>	<i>F.breve</i>	<i>W.virosa</i>
	Yes	No	No	No	No
Probability	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000
Percent Probability	72.78%	18.84%	6.22%	1.22%	0.43%
Likelihood	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%
Human Isolate	Yes	Yes	Yes	No	Yes
<b>Tests against</b>					
Test 1	MOT (99.9%)	ONP (0.1%)	IND (99.9%)	ONP (0.1%)	NIT (0.1%)
Test 2	TDA (0.1%)	VP (0.1%)	VP (0.1%)	VP (0.1%)	ONP (0.1%)
Test 3	LYS (90%)	TDA (0.1%)	TDA (0.1%)	TDA (0.1%)	VP (0.1%)
<b>Additional Tests</b>					
Oxidation of Glucose	0.1%	0.1%	99.9%	99.9%	0.1%
Growth in 6% NaCl	99.9%	8%	7%	0.1%	0%
Esculin Hydrolysis	34%	0.1%	99%	0.1%	0.1%
Growth on MacConkey	99.9%	70%	89%	99.9%	3%
Growth in 0% NaCl	0.1%	43%	99.9%	99.9%	0%
<b>Additional Comments</b>					
	9 Previously CDC group III, occasionally isolated from urine and vaginal samples				9

**Identification Comments**

Unacceptable Identification of *Vibrio alginolyticus*  
 The strain is not typical (multiple tests are against), and it is moderately well separated from other suggested identification choices  
 ADDITIONAL TESTS MAY IMPROVE THE IDENTIFICATION.