



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

**“ESTUDIO MICROBIOLÓGICO DE LAS AGUAS TERMO-  
MINERALES DEL BALNEARIO “SANTA ANA” DE BAÑOS DE  
AGUA SANTA-TUNGURAHUA”**

Trabajo de titulación presentado para optar al grado académico de:

**BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA**

**AUTOR: PATRICIA ELIZABETH MACAS LUZURIAGA**

**TUTOR: DRA. SANDRA ESCOBAR**

**RIOBAMBA – ECUADOR**

**2015**

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

El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que: El trabajo de investigación: “ESTUDIO MICROBIOLÓGICO DE LAS AGUAS TERMO-MINERALES DEL BALNEARIO “SANTA ANA” DE BAÑOS DE AGUA SANTA-TUNGURAHUA”, de responsabilidad de la egresada Patricia Elizabeth Macas Luzuriaga, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Titulación, quedando autorizada su presentación.

	<b>FIRMA</b>	<b>FECHA</b>
Dra. Sandra Escobar <b>DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN</b>	_____	_____
Dr. Gerardo Medina <b>MIEMBRO DEL TRIBUNAL DOCUMENTALISTA SISBIB –ESPOCH</b>	_____	_____
<b>NOTA DEL TRABAJO TITULACIÓN</b>	_____	

Yo, Patricia Elizabeth Macas Luzuriaga, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en este Trabajo de Titulación; y el patrimonio intelectual del Trabajo de Titulación, pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO.

---

**PATRICIA ELIZABETH MACAS LUZURIAGA**

## **DEDICATORIA**

A Dios que es la razón de mi vida

A mi madre Mersi Luzuriaga que me ama incondicionalmente y ha estado a mi lado siendo un ejemplo de vida.

A mi padre Marco Macas que me ha brindado su amor, apoyo emocional y económico.

A mis hermanas Johana Macas y Jesarela Macas a quienes amo grandemente y siempre me han llenado de alegría.

**Patricia.**

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios por estar junto a mí en todo momento, llenándome de fuerzas para seguir adelante y darme la oportunidad de culminar una meta más en mi vida.

A mis padres y hermanas por apoyarme y amarme incondicionalmente. Por estar siempre a mi lado dándome ánimos y ser las personas que más amo en el mundo.

A la Dra. Sandra Escobar directora de tesis y al Dr. Gerardo Medina colaborador de la misma, por su contribución necesaria en la elaboración de la presente investigación.

Al Dr. Félix Andueza por su tiempo y conocimiento aportado en el transcurso de la investigación.

A las Doctoras Aida, Isabel y Patricia por su colaboración y paciencia, que facilitaron y agilizaron la culminación del presente trabajo de investigación.

A mis amigos y demás familiares por el apoyo que me transmitieron durante la elaboración de la presente investigación.

**Patricia.**

## TABLA DE CONTENIDO

CONTENIDO	Páginas
RESUMEN.....	xvi
SUMARY.....	xvii
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPITULO I.....	3
1 MARCO TEÓRICO REFERENCIAL.....	3
1.1 Historia de las aguas termo-minerales.....	3
1.2 Aguas termo-minerales.....	5
1.3 Manantiales termo-minerales.....	7
1.4 Clasificación de las aguas termo-minerales.....	7
1.4.1 <i>Clasificación de las aguas según su temperatura</i> .....	7
1.4.2 <i>Clasificación de las aguas según los valores de presión osmótica</i> .....	8
1.4.3 <i>Clasificación según la mineralización de las aguas</i> .....	8
1.4.4 <i>Clasificación de las aguas según sus usos</i> .....	10
1.5 Beneficios del tratamiento con aguas termales.....	10
1.6 Aguas termo-minerales de Baños de Agua Santa.....	11
1.6.1 <i>Aguas termo-minerales del Balneario Ecológico “Santa Ana”</i> .....	11
1.7 Microorganismos presentes en las aguas termo-minerales.....	12
1.7.1 <i>Microorganismos autóctonos</i> .....	12
1.7.2 <i>Microorganismos alóctonos</i> .....	12
1.8 Taxonomía microbiana.....	12
1.8.1 <i>Género</i> .....	13
1.8.2 <i>Especie</i> .....	13
1.8.3 <i>Cepa</i> .....	13

1.8.4	<i>Clasificación de los microorganismos</i> .....	14
1.9	<b>Bacterias</b> .....	14
1.9.1	<i>Clasificación de las bacterias</i> .....	14
1.9.2	<i>Género Aeromonas</i> .....	15
1.9.3	<i>Género Falvobacterium</i> .....	15
1.9.4	<i>Género Shewanella</i> .....	16
1.9.5	<i>Género Bacillus</i> .....	16
1.9.6	<i>Género Staphylococcus</i> .....	16
1.10	<b>Análisis microbiológico de las aguas termo-minerales</b> .....	17
1.10.1	<i>Bacterias aerobias mesófilas</i> .....	17
1.10.2	<i>Staphylococcus</i> .....	17
1.10.3	<i>Mohos y levaduras</i> .....	17
1.10.4	<i>Coliformes totales y fecales</i> .....	18
1.11	<b>Medios de cultivo</b> .....	18
1.11.1	<i>Clasificación de los medios de cultivo</i> .....	18
1.11.2	<i>Placas 3M Petriilm</i> .....	19
1.11.3	<i>Agar Mueller Hinton</i> .....	20
1.11.4	<i>Agar Eosina Azul de Metileno</i> .....	20
1.11.5	<i>Agar Manitol Salado</i> .....	20
1.11.6	<i>Agar MacConkey</i> .....	20
1.11.7	<i>Agar Kligler</i> .....	21
1.11.8	<i>Agar SIM</i> .....	21
1.11.9	<i>Agar Urea</i> .....	21
1.11.10	<i>Agar de citrato de Simmons</i> .....	21
1.11.11	<i>Medio basal OF de Hugh y Leifson</i> .....	21
1.11.12	<i>Agar almidón</i> .....	21
1.11.13	<i>Agar gelatina</i> .....	22

1.12	Identificación de microorganismos.....	22
1.12.1	<i>Inoculación y aislamiento de bacterias</i> .....	22
1.12.2	<i>Repiques</i> .....	22
1.12.3	<i>Cultivo puro de bacterias</i> .....	22
1.12.4	<i>Descripción macroscópica</i> .....	23
1.12.5	<i>Preparación y tinción de las muestras</i> .....	23
1.12.5.1	<i>Tinción Gram</i> .....	23
1.12.6	<i>Pruebas bioquímicas</i> .....	24
1.12.7	<i>Prueba de catalasa</i> .....	24
1.12.8	<i>Prueba de oxidasa</i> .....	24
1.12.9	<i>Prueba de oxidación-fermentación</i> .....	24
1.12.10	<i>Prueba de hidrólisis de gelatina</i> .....	25
1.12.11	<i>Prueba de hidrólisis del almidón</i> .....	25
1.12.12	<i>Prueba en agar con hierro de Kligler</i> .....	26
1.12.13	<i>Prueba de movilidad</i> .....	27
1.12.14	<i>Prueba de indol de Kovacs</i> .....	27
1.12.15	<i>Prueba de ureasa</i> .....	27
1.12.16	<i>Prueba de citrato</i> .....	28
1.13	Sistema de identificación de bacterias Microgen™ GnA+B-ID System.....	28
1.14	Antibiograma.....	29
<b>CAPITULO II.....</b>		<b>30</b>
2	<b>MARCO METODOLÓGICO.....</b>	<b>30</b>
2.1	<b>Lugar y factores de Investigación.....</b>	<b>30</b>
2.2	<b>Materia prima.....</b>	<b>31</b>
2.3	<b>Materiales, equipos, reactivos y medios de cultivo.....</b>	<b>31</b>
2.3.1	<i>Materiales</i> .....	31



2.3.2	<i>Equipos y Reactivos</i> .....	32
2.3.3	<i>Medios de cultivo</i> .....	32
2.4	<b>Métodos y técnicas</b> .....	33
2.4.1	<i>Muestreo</i> .....	33
2.4.2	<i>Análisis físico-químicos</i> .....	33
2.4.3	<i>Siembra de microorganismos</i> .....	33
2.4.4	<i>Determinación el número de bacterias</i> .....	34
2.4.5	<i>Caracterización macroscópica de las colonias</i> .....	35
2.4.6	<i>Preparación de medios de cultivo y reactivos</i> .....	35
2.4.6.1	<i>Preparación de Agar Mueller Hinton, Eosina Azul de Metileno, Manitol Salado y MacConkey</i> .....	35
2.4.6.2	<i>Preparación de Agar Kligler, SIM, urea y citrato de Simmons</i> .....	35
2.4.6.3	<i>Agar almidón</i> .....	36
2.4.6.4	<i>Agar gelatina</i> .....	36
2.4.6.5	<i>Reactivo de cloruro mercúrico</i> .....	36
2.4.6.6	<i>Agar Hugh-Leifson</i> .....	37
2.4.7	<i>Realización de repiques</i> .....	37
2.4.8	<i>Aislamiento bacteriano</i> .....	37
2.4.9	<i>Determinación de bacterias Gram positivas y Gram negativas</i> .....	38
2.4.10	<i>Prueba de la catalasa</i> .....	38
2.4.11	<i>Prueba de la oxidasa</i> .....	38
2.4.12	<i>Hidrólisis del almidón</i> .....	39
2.4.13	<i>Hidrólisis de la gelatina</i> .....	39
2.4.14	<i>Prueba de oxidación-fermentación</i> .....	39
2.4.15	<i>Prueba en agar con hierro de Kligler</i> .....	39
2.4.16	<i>Prueba de movilidad</i> .....	40
2.4.17	<i>Prueba de indol de Kovacs</i> .....	40

2.4.18	<i>Prueba de ureasa</i> .....	41
2.4.19	<i>Prueba de citrato</i> .....	41
2.5	Sistema de identificación de bacterias Microgen™GnA+B-ID System....	41
2.6	Antibiograma.....	42
2.7	Flujogramas de identificación de género y especie de las colonias aisladas de la muestra de la vertiente y piscina del Balneario Ecológico “Santa Ana”.....	44
CAPITULO III.....		50
3	MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	50
3.1	Parámetros físico-químicos del agua de la vertiente y piscina del Balneario Ecológico “Santa Ana”.....	50
3.2	Resultado del conteo de Bacterias Aerobias Mesofilas presentes en la vertiente y piscina del Balneario Ecológico “Santa Ana”.....	53
3.3	Resultado del conteo de bacterias Coliformes totales y Coliformes fecales presentes en la vertiente y piscina del Balneario Ecológico "Santa Ana".....	55
3.4	Resultado del conteo de bacterias <i>Staphylococcus aureus</i> presentes en la vertiente y piscina del Balneario Ecológico “Santa Ana”.....	57
3.5	Resultado del conteo de Mohos y levaduras presentes en la vertiente y piscina del Balneario Ecológico “Santa Ana”.....	59
3.6	Características macroscópicas de las colonias aisladas de la vertiente y piscina del Balneario Ecológico “Santa Ana”.....	62
3.7	Morfología y propiedad tintorial de las colonias aisladas de la vertiente y Piscina del Balneario Ecológico “Santa Ana”.....	63
3.8	Pruebas bioquímicas de bacilos Gram negativos aislados de la vertiente y piscina del Balneario Ecológico “Santa Ana”.....	66
3.9	Pruebas bioquímicas de bacterias Gram positivas aisladas de la vertiente y piscina del Balneario Ecológico “Santa Ana”.....	68

<b>3.10</b>	<b>Resultados del sistema de identificación de bacterias Microgen™ GnA+B-ID System.....</b>	<b>70</b>
<b>3.11</b>	<b>Géneros y especies bacterianas identificadas de las colonias aisladas de la vertiente y piscina del Balneario Ecológico “Santa Ana”.....</b>	<b>71</b>
<b>3.12</b>	<b>Antibiograma de las especies bacterianas identificadas de la vertiente y piscina del Balneario Ecológico “Santa Ana”.....</b>	<b>74</b>
	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>77</b>
	<b>RECOMENDACIONES</b>	<b>79</b>
	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	
	<b>ANEXOS</b>	

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1-1</b>	Clasificación de las aguas termales de acuerdo a la temperatura.....	7
<b>Tabla 2-1</b>	Clasificación de las aguas desde el punto de vista hidroterapéutico.....	8
<b>Tabla 3-1</b>	Clasificación de las aguas según la presión osmótica.....	8
<b>Tabla 4-1</b>	Clasificación de las agua mineral según componentes.....	10
<b>Tabla 5-1</b>	Clasificación de las bacterias.....	15
<b>Tabla 6-1</b>	Clasificación de las <i>Aeromonas</i> .....	16
<b>Tabla 1-2</b>	Materiales usados.....	31
<b>Tabla 2-2</b>	Equipos y reactivos usados.....	32
<b>Tabla 3-2</b>	Medios de cultivos usados.....	32
<b>Tabla 4-2</b>	Composición del agar almidón.....	36
<b>Tabla 5-2</b>	Composición del agar gelatina.....	36
<b>Tabla 6-2</b>	Composición del agar Hugh Leifson.....	37
<b>Tabla 1-3</b>	Resultados del análisis físico-químico del agua de la vertiente y piscina del Balneario “Santa Ana”.....	50
<b>Tabla 2-3</b>	Resultado del análisis de Aerobias Mesófilas.....	53
<b>Tabla 3-3</b>	Resultados de análisis de coliformes fecales y totales.....	55
<b>Tabla 4-3</b>	Resultados de análisis de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	57
<b>Tabla 5-3</b>	Resultados de análisis de Mohos y Levaduras.....	59
<b>Tabla 6-3</b>	Resultados de las características macroscópicas de las colonias aisladas de la vertiente y piscina.....	62
<b>Tabla 7-3</b>	Resultados de la tinción Gram de las cepas aisladas.....	63
<b>Tabla 8-3</b>	Resultados de pruebas bioquímicas de bacilos Gram negativos aislados de la vertiente y piscina del Balneario “Santa Ana”.....	66
<b>Tabla 9-3</b>	Resultados de pruebas bioquímicas de bacilos Gram positivos aislados.....	67
<b>Tabla 10-3</b>	Identificación de la cepa MV2-4.....	69
<b>Tabla 11-3</b>	Resultados de géneros y especie bacteriana identificadas de las colonias aisladas.....	71
<b>Tabla 12-3</b>	Resultados de Antibiograma de las especies bacterianas identificadas.....	74

## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

<b>Figura 1-1</b>	Mapa de ubicación del Balneario “Santa Ana” (Baños Tungurahua).....	11
<b>Figura 2-1</b>	Árbol filigenético universal. Dominios: Bacteria, Archaea.....	13
<b>Figura 1-2</b>	Balneario “Santa Ana”.....	30
<b>Figura 2-2</b>	<i>Siembra en Placas 3M™ Petrifilm™</i> .....	34
<b>Figura 3-2</b>	Identificación de las cepas MV1-1, MV1-2, MV13.....	44
<b>Figura 4-2</b>	Identificación de las cepas MV2-4, MV2-5, MV2-6.....	45
<b>Figura 5-2</b>	Identificación de las cepas MP1-7, MP1-8, MP1-9.....	46
<b>Figura 6-2</b>	Identificación de las cepas MP1-10, MP2-11, MP2-12.....	47
<b>Figura 7-2</b>	Identificación de las cepas MP2-13, MP2-14, MP2-15.....	48
<b>Figura 8-2</b>	Identificación de las cepas MP2-16, MP2-17.....	49
<b>Figura 1-3</b>	Recuento de Aerobios Mesófilos Totales del Balneario “Santa Ana”....	53
<b>Figura 2-3</b>	Recuento de <i>Escherichia coli</i> y Coliformes Totales de “Santa Ana”....	55
<b>Figura 3-3</b>	Recuento de <i>Staphylococcus</i> del Balneario “Santa Ana”.....	57
<b>Figura 4-3</b>	Recuento de Mohos del Balneario “Santa Ana”.....	59
<b>Figura 5-3</b>	Recuento de Levaduras del Balneario “Santa Ana”.....	60
<b>Figura 6-3</b>	Bacterias Gram Positivas, Gram Negativas.....	64

## ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO A** Balneario Ecológico “Santa Ana”
- ANEXO B** Toma de muestras de agua
- ANEXO C** Medida de parámetros físico-químicos
- ANEXO D** Siembra e incubación de la muestra de vertiente y piscina en las placas  
Petri film
- ANEXO E** Resultados del recuento de bacterias de la muestra de la vertiente de agua a  
las 48 horas de incubación a 35°C
- ANEXO F** Resultados del recuento de bacterias de la muestra de la piscina tras 48 horas  
de incubación a 35°C
- ANEXO G** Repique y aislamiento de bacterias
- ANEXO H** Resultado de los repiques de las bacterias de la muestra de la vertiente
- ANEXO I** Resultado de los repiques de las bacterias de la muestra de la piscina
- ANEXO J** Resultado de la tinción Gram de las bacterias aisladas de la muestra de la  
Vertiente
- ANEXO K** Resultado de la tinción Gram de las bacterias aisladas de la muestra de la  
Piscina
- ANEXO L** Resultados de la prueba de catalasa y oxidasa de las colonias aisladas de la  
vertiente y piscina
- ANEXO M** Resultados de las pruebas bioquímicas de las colonias aisladas de la muestra  
de la vertiente
- ANEXO N** Resultados de las pruebas bioquímicas de las colonias aisladas de la muestra de  
la piscina
- ANEXO O** Resultados del análisis de la colonia MV2-4 en el sistema de identificación de  
bacterias Microgen™ GnA+B-ID System
- ANEXO P** Antibiograma

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<b>%</b>	Porcentaje
<b>°C</b>	Grados Celsius
<b>mL</b>	Mililitros
<b>mg/l</b>	Miligramos por litro
<b>ppm</b>	Partes por millón
<b>Meq</b>	Miliequivalentes
<b>Ac</b>	Acido
<b>Alc</b>	Alcalino
<i>et al</i>	y colaboradores
<b>F</b>	Fermentativo
<b>GAD</b>	Gobierno Autónomo Descentralizado
<b>m.s.n.m.</b>	Metros sobre el nivel del mar
<b>O</b>	Oxidativo
<b>UFC/ml</b>	Unidades formadoras de colonias por mililitro

## RESUMEN

En la presente investigación se realizó el análisis microbiológico de las muestras de aguas termales, tomadas de la vertiente y una piscina del Balneario Ecológico “Santa Ana”, ubicado en el cantón Baños de Agua Santa de la provincia de Tungurahua. El estudio se desarrolló en el Laboratorio de Análisis Bioquímicos y Bacteriológicos de la Escuela de Bioquímica y Farmacia de la Facultad de Ciencias. Se aislaron 17 cepas bacterianas en total de la vertiente y la piscina, de las cuales la mayoría fueron bacterias Gram negativas. Se aislaron 6 cepas bacterianas de la vertiente, todas bacilos Gram negativos y 11 cepas bacterianas de la piscina, de las cuales 8 fueron bacilos Gram negativos, 2 bacilos Gram positivos y una cocos Gram positivos. De las cepas bacterianas aisladas se logró identificar a nivel de género y especie a 14 bacterias, por medio de pruebas bioquímicas y una cepa bacteriana por el método Microgen™ GnA+B-ID System. En el caso de las bacterias Gram negativas aisladas de la vertiente, se identificaron las especies de *Flavobacterium aquatile*, *Aeromonas eucrenophila*, *Aeromonas media* y *Shewanella putrefaciens*, las especies encontradas con mayor frecuencia fueron *Aeromonas media* y *Flavobacterium aquatile*. Las especies encontradas en la muestra de la piscina fueron *Aeromonas media*, *Aeromonas schubertii* y *Aeromonas caviae*, en el caso de las bacterias Gram positivas se encontraron el género *Bacillus spp.*, también se encontraron especies de *Staphylococcus aureus*, la especie aislada con mayor frecuencia fue *Aeromonas media*. Se realizó el recuento de mohos y levaduras, por el método de las Placas 3M Petrifilm, en donde se encontró un mayor número de mohos y levaduras en la muestra de la piscina, siendo escasos en la muestra de la vertiente. De los resultados obtenidos se puede deducir que las aguas termales del Balneario “Santa Ana” son recomendables para el uso recreacional, y su estudio está a disposición del GAD Municipal de la ciudad de Baños de Agua Santa.

**PALABRAS CLAVE:** <BALNEARIO “SANTA ANA”> <AGUAS TERMOMINERALES>  
<AGUAS HIPERTERMALES> <MICROORGANISMOS AUTÓCTONOS>  
<MICROORGANISMOS ALÓCTONOS> <COLONIAS PURAS> <ANTIBIOGRAMA>  
<AISLAMIENTO BACTERIANO> <PLACAS PETRIFILM [MEDIO DE CULTIVO]>



## ABSTRACT

In the present investigation the microbiological analysis of samples of hot springs, taken from the shed and a pool of Ecological Resort “Santa Ana”, located in the canton Baños de Agua Santa in the province of Tungurahua was performed. The study was conducted at the Laboratory of Biochemical and Bacteriological Analyzes of the School of Biochemistry and Pharmacy, Faculty of Sciences. They were isolated in total 17 bacterial strains shed and pool, of which most were Gram negative bacteria. 6 bacterial strains shed all Gram negative bacilli and 11 bacterial strains of the pool, of which 8 were Gram negative bacilli, 2 Gram positive bacilli and one cocci Gram positive were isolated. Of bacterial isolates it was able to identify to genus and 14 species bacteria through biochemical tests and a bacterial strains by the Microgen™ GnA+B-ID System method. In the case of Gram negative bacteris isolated from the side, species *Flavobacterium aquatile*, *Aeromonas eucrenophila*, *Aeromonas media*, *Shewanella putrefaciens* were identified, the species found most frequently were average *Aeromonas media* and *Flavobacterium aquatil*. The species found in the sample pool were *Aeromonas media*, *Aeromonas caviae* and *Aeromonas schubertii* in the case of Gram positive bacteria genus *Bacillus spp*. They were found *Staphylococcus aureus* species, the species most frequently isolated was also found *Aeromonas media*. Count of molds and yeasts was performed by the method of 3M Petrifilm Plates, where a greater number of molds and yeasts were found in the sample pool, rare in the sample being shed. From the results it can be deduced that the thermal waters of the Spa “Santa Ana” are recommended for recreational use and its study is available to the Municipal DSG (Decentralized Self-Government) city of Baños de Agua Santa.

**KEYWORDS:** <RESORT “SANTA ANA”> <THERMOWATER>  
<HYPERTHERMALWATER> <NATIVE MICRO> <MICRO ALLOCHTHONOUS>  
<COLOGNES PURE> <SUSCEPTIBILITY> <BACTERIAL ISOLATION> <PATRIFILM PLATES> <CULTURE MEDIUM>

## INTRODUCCIÓN

En la actualidad el Ecuador se está convirtiendo en una potencia turística, en donde los establecimientos termales o balnearios han tenido una gran acogida por la población en general y por los turistas que asisten al país, resultando de mucha importancia conocer con amplitud las características fisicoquímicas y microbiológicas de las aguas termales provenientes de las vertientes naturales, que son utilizadas en los establecimientos turísticos tanto para recreación como también con fines medicinales.

La ciudad de Baños de Agua Santa, perteneciente a la provincia de Tungurahua, es conocida por la existencia de aguas termales las cuales se le han atribuido propiedades beneficiosas para la salud. Se dice que desde la antigüedad acudían colonos, comerciantes, misioneros, viajeros y aventureros a refrescarse en las vertientes de aguas termales. Con el pasar del tiempo se ha incrementado el número de turistas que visitan esta ciudad, y con esto surge la necesidad de realizar estudios microbiológicos del agua, para tener conocimiento de los microorganismos que estas poseen de forma natural y prevenir posibles contaminaciones.

Existen diversos estudios realizados a nivel mundial sobre las aguas termo-minerales, los cuales nos dan una idea general de la calidad de estas, sin dejar de lado el hecho de que cada agua termal tiene sus características propias que le confiere el entorno en el que se encuentra. Este tipo de estudios son de gran importancia porque aportan los conocimientos que nos ayudaran a comprender de manera más amplia las condiciones fisicoquímicas, microbiológicas y ambientales de las aguas termo-minerales que son usadas por millones de personas todos los días.

En el Ecuador no existen previos estudios microbiológicos de las aguas termales, y siendo que es uno de los principales atractivos turísticos, resulta de vital importancia analizar la calidad microbiológica de las aguas termales y consecuentemente prevenir posibles contaminaciones microbianas asegurando la salud de los usuarios que asisten a los diferentes balnearios. Además de lo anteriormente expuesto, Ecuador posee una gran biodiversidad y recursos genéticos, por lo que es posible descubrir microorganismos nunca antes estudiados, así como también las aguas termales pueden contener microorganismos que poseen actividades enzimáticas de interés industrial.

El Plan Nacional del Buen Vivir tiene como tercer objetivo: mejorar la calidad de vida de la población ya que la Constitución, en el artículo 66, establece “el derecho a una vida digna, que asegure la salud, alimentación y nutrición, agua potable, vivienda, saneamiento ambiental, educación, trabajo, empleo, descanso y ocio, cultura física, vestido, seguridad social y otros servicios necesarios”.

Dentro del objetivo de mejorar la calidad de vida de la población se encuentra el derecho al saneamiento ambiental y a una vida digna que asegure la salud, es por esto que, al ser Baños una ciudad altamente turística que tiene como principal atractivo los balnearios de aguas termales, deben existir estudios que certifiquen la calidad del agua que está siendo utilizada. Este tipo de estudios poseen gran importancia por los beneficios que prestan a la economía de la ciudad, que depende en gran parte de la afluencia de turistas tanto nacionales como extranjeros.

El cantón Baños de Agua Santa posee una población de 20.000 habitantes aproximadamente y es una de las principales ciudades turísticas de la zona 3. El Balneario Ecológico “Santa Ana” acoge aproximadamente a 400 turistas todos los fines de semana, llegando hasta 2000 turistas en feriado, representando un gran ingreso económico para esta ciudad.

Por lo tanto la presente investigación hace referencia al estudio microbiológico realizado en las aguas termales del Balneario Ecológico “Santa Ana”, ubicado en el Cantón Baños de agua Santa, Provincia de Tungurahua. Con el fin de identificar la micro-biota autóctona que tiene como hábitat la fuente de aguas termales y las condiciones física en las que esta se desarrolla, y de esta manera contribuir al mejoramiento de la calidad de servicio de este establecimiento público.

Los microorganismos aislados crecieron en diferentes medios de cultivo, hasta obtener cepas puras y se identificaron por medio de pruebas bioquímicas y el método de las galerías Microgen TM Gna+B-ID System. A las cepas aisladas también se les sometió a estudios de susceptibilidad a los antibióticos por medio del método de Kirby Bauer de difusión en agar.

El presente, es un estudio de interés para los usuarios y los propietarios de los balnearios, ya que las aguas termales que brotan de las diferentes vertientes están sujetas a cambios externos que pueden perjudicar la calidad microbiológica de la misma, y con el conocimiento de la micro biota autóctona se podría tomar correctivos que evite posibles riesgos de contaminación y los turistas puedan disfrutar con toda seguridad los Baños en este tipo de aguas. Además de lo anteriormente expuesto, la presente investigación sirve como sustento de la calidad microbiológica de las aguas termales del Balneario Santa Ana, y consecuentemente brindara una mayor confianza a los usuarios que lo frecuenta.

# CAPÍTULO I

## 1 MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

### 1.1 Historia de las aguas termo-minerales

Según leyendas muy antiguas, las propiedades terapéuticas que contienen las aguas termales eran usadas por los animales, tales como los ciervos, jabalíes y osos, también por aves como los cisnes, garzas y grullas los cuales solían visitar estos lugares cuando se encontraban heridos para curar sus patas, alas, etc. (FAGUNDO, J., 2014, p. 2)

Los seres humanos aprendieron observando a estos animales sobre las cualidades que poseían las aguas termales, lo que resulto muy beneficioso ya que en la antigüedad no existían medicamentos para tratar las diferentes enfermedades. (FAGUNDO, J., 2014, p. 2)

Los científicos estiman que existía un conocimiento sobre las propiedades curativas de las aguas termales por parte del hombre primitivo de la edad de piedra. Los primeros balnearios de aguas minero-medicinales se considera que datan de hace 2000 a.C. ya que se han encontrado evidencias de la existencia de balnearios en la ciudad india de Mojenjo-Daro y en la ciudad de Epidauros, en la Antigua Grecia. También han aparecido instalaciones en la isla griega de Creta (entre 1700 y 1400 a.C.) y en la ciudad egipcia de Tel el-Amarna (1360 a.C.). (FAGUNDO, J., 2014, p. 2)

Los griegos poseían centros médicos que disponían de manantiales de aguas termales para facilitar las técnicas hidroterapéuticas, entre estos manantiales destacaron los de Cos, Cnido, Pérgamo, Peloponeso, Rodas, etc. En aquella época la medicina tuvo un gran desarrollo ya que se inspiraban en Asclepio, el dios griego de la medicina. En aquella época ya se atribuía propiedades terapéuticas a las aguas termales y se lo llevaba a cabo como lo realizaban los pueblos primitivos. (FAGUNDO, J., 2014, p. 3)

En un principio las aguas termales solo disponían de agua fría y se las ponía en tinas para baño al momento de su uso. A finales del siglo V a.C. se empiezan a construir complejas instalaciones independientes. En Grecia y en Roma los baños se convertían en complejos rituales y se acompañaban de ejercicios y masajes. (FAGUNDO, J., 2014, p. 3)

En Roma también se encontró vestigios de termas antiguas las cuales son las de Stabiano en la ciudad de Pompeya que se conservan hasta hoy, estas fueron construidas en el siglo II a.C. en donde en ocasiones se llevaba el aguas desde fuentes lejanas para abastecer las termas. En aquella época se construyeron en Roma muchas termas públicas. Durante la dominación romana también se expandieron sus hábitos y entre ellos sus prácticas de las curas balnearias. (FAGUNDO, J., 2014, p. 3)

Durante toda la etapa medieval hubo un uso reducido de los baños termales ya que se impuso durante este periodo la iglesia cristiana la cual profesaba la limpieza espiritual y consideraba a las termas romanas como lugares de perversión, por lo que empezó a escasear el agua y se hizo habitual el poco aseo personal. (FAGUNDO, J., 2014, p. 3)

En los lugares en donde tardo en imponerse las ideologías de la iglesia como sucedió en Escandinavia, donde cada casa contaba con un espacio especial llamado sauna en el cual primero se aplicaban baños de agua templada y posteriormente de agua fría. (FAGUNDO, J., 2014, p. 3)

Después los árabes invadieron en sur de Europa, y con esto se reintegraron los baños públicos, en donde las grandes ciudades disponían de al menos uno de estos baños públicos. Entre estos se destaca El Baño Real de la Alambra en Granada. Posteriormente con la reconquista de España por parte de los reyes católicos, fueron expulsados los musulmanes del territorio ibérico y las prácticas de las curas balnearias fueron nuevamente restringidas ya que los que las realizaba eran considerados herejes. (FAGUNDO, J., 2014, p. 4)

En Constantinopla a diferencia de los cambios sufridos en España, durante el imperio bizantino, se mantuvieron las costumbres romanas y perduraron hasta llegar a reforzarse durante el imperio turco. Otro factor que ayudo en el florecimiento de las curvas termales fueron las cruzadas ya que las aguas minero-medicinales fueron usadas para tratar a los heridos y combatir enfermedades que se contraía en Oriente. (FAGUNDO, J., 2014, p. 4)

A partir del siglo XV surge el renacimiento, en el cual hubo avances en el campo de la medicina en general, pero no hubo adelantos significativos en el campo de la balneoterapia. Sin embargo, con el descubrimiento geográfico, pusieron de manifiesto el uso de las aguas termales por parte de los pobladores del Nuevo Mundo. (FAGUNDO, J., 2014, p. 4)

En el siglo XIX debido a la acumulación de las personas en las grandes ciudades europeas, se produjo un brote de cólera y con este suceso se vio la necesidad de construir baños tanto públicos como privados para mejorar la higiene y prevenir este tipo de incidentes. (FAGUNDO, J., 2014, p. 4)

En la actualidad la hidrología médica forma parte de la terapéutica, y se ha sustentado gracias a los avances de la ciencia. Hoy en día se conocen las sustancias químicas que componen estas aguas, sus orígenes, la función que cumplen en el organismo, etc. a pesar de todos estos avances, los tratamientos con aguas termales no han vuelto a tener el lugar privilegiado que ocupaban en épocas anteriores, esto debido al desarrollo de la medicina en general, en especial de las terapias medicamentosas y los avances en cirugía que actualmente existen. (FAGUNDO, J., 2014, p. 5)

En el año 1986 el uso de las aguas termales fue reconocido como una herramienta alternativa para tener una buena salud física y mental, de esta manera surgió una nueva disciplina que se denominó hidrología médica, la cual es parte de las ciencias naturales que trata de las aguas y que ha sido aceptada como medicina complementaria por la Organización Mundial de la Salud. (FAGUNDO, J., 2014, p. 5)

## **1.2 Aguas termo-minerales**

Se llaman aguas termales a las aguas minerales que salen del suelo con más de 5 °C que la temperatura superficial. Las cuales constituyen un recurso natural que yace en estratos acuíferos subterráneos. Las normas establecen que el agua mineral debe poseer generalmente más de un gramo de minerales disueltos por kilogramo de agua o componentes especiales en cantidades superiores a determinadas proporciones, además se establece restricciones en relación a la temperatura y no deben poseer gérmenes patógenos. (CLAPES, 200, p. 75)

Las aguas termales surgen de capas subterráneas de la tierra, las cuales se encuentran a mayor temperatura, y son ricas en diferentes componentes minerales por esta razón son llamadas aguas minero-medicinales y permiten su utilización en la terapéutica como baños, inhalaciones, irrigaciones, y calefacción. (DE LA ROSA. et al., 2004, p. 521)

Por lo general se encuentran a lo largo de líneas de fallas ya que a lo largo del plano de falla pueden introducirse las aguas subterráneas que se calientan al llegar a cierta profundidad y suben después en forma de vapor (que puede condensarse al llegar a la superficie, formando un géiser) o de agua caliente. (DE LA ROSA. et al., 2004, p. 525)

Las diferentes normas y códigos alimentarios definen a las diferentes aguas tomando en cuenta las características y la utilización de cada una. Entre estas definiciones tenemos: Agua mineral natural: Esta es un agua que se diferencia por contener determinadas sales minerales y en sus proporciones relativas, estas aguas se obtienen directamente de fuentes naturales o a su vez perforadas de aguas subterráneas procedentes de estratos acuíferos. (OMS, 1998, p. 108)

Agua mineral medicinal es: Agua que por las características y composición que posee, puede ser utilizada con fines terapéuticos, siendo estas propiedades demostradas por experiencia local, los estudios correspondientes, ensayos clínicos, etc. y luego de ser envasada conservar sus efectos beneficiosos para la salud. (FAGUNDO et al., 2001, p. 2)

Agua mineral industrial: Agua mineral que debido a su composición tanto cuantitativa como cualitativa permite un aprovechamiento de los minerales que contiene. (FAGUNDO et al., 2001, p. 2)

Según la norma INEN 2178. Agua mineral natural carbonatada es aquella agua mineral natural efervescente, en donde el contenido de gas carbónico proviene de la fuente. (INEN, 1982, p.8)

Agua mineral natural no carbonatada: Agua mineral natural no efervescente, este tipo de agua no libera gas carbónico a la salida de la fuente de manera que sea perceptible en condiciones normales. (INEN, 1982, p.8)

Agua mineral natural reforzada con gas de la fuente. Agua mineral natural efervescente cuyo contenido de gas carbónico proviene de la fuente, luego de un tratamiento y envasado, es superior que al determinado al surgir de la fuente. (INEN, 1982, p.8)

Agua mineral natural con adición de gas carbónico: Agua mineral natural que se le ha hecho efervescente por adición de gas carbónico de origen diferente al de la fuente de la cual proviene, luego de un tratamiento y envasado. (INEN, 1982, p.8)

Agua mineral natural descarbonatada: Agua mineral natural cuyo contenido de gas carbónico proviene de la fuente ha sido eliminado total o parcialmente, luego de un tratamiento y posterior envasado. (INEN, 1982, p.8)

## 1.2 Manantiales termo-minerales

Los manantiales termales son las manifestaciones superficiales más difundidas en todo el mundo y presentan también una gran variedad tanto en temperatura como en composición química. Estos manantiales se diferencian por poseer propiedades favorables para la salud. (GETA, 200, p. 160)

Los manantiales de aguas termales se diferencian de otro tipo de manifestaciones ya que no necesariamente están relacionados con zonas de vulcanismo reciente, aunque los manantiales termales de altas temperatura generalmente si lo están. (LEDESMA, 1988, p.1693)

Las aguas se calientan debido al aumento de temperatura en el interior de la tierra ya que a una profundidad de tres kilómetros se encuentran temperaturas de más de 100 °C, es por esto que las aguas que circulen a estas profundidades sufrirán un aumento de temperatura y al alcanzar la superficie brotara en forma de un manantial termal. (LEDESMA, 1988, p.1695)

## 1.4 Clasificación de las aguas termo-minerales

Las aguas de los diferentes balnearios poseen una composición y propiedades físicas diferentes es por esto que cada agua tienen sus propias características y propiedades terapéuticas. Según Fagundo Castillo las aguas termales y minerales pueden clasificarse de acuerdo a diferentes criterios y puntos de vista, como son: físico, químico, físico-químico, bacteriológico, etc. (FAGUNDO, J., 2014, p. 24)

### 1.4.1 Clasificación de las aguas según su temperatura

1. Para realizar una clasificación de acuerdo con este criterio es necesario tomar en cuenta la temperatura del ambiente así como también la del suelo ya que se consideran termales las aguas que brotan con una temperatura mayor a la temperatura media anual del aire. (FAGUNDO et al., 2001, p. 4)

**Tabla 1-1:** Clasificación de las aguas termales de acuerdo a la temperatura.

Tipo	Descripción
Hipo-termales	$T < 4^{\circ}\text{C}$ a la $T_{ma}$
Orto-termales	$T = T_{ma}$
Hiper-termales	$T > 4^{\circ}\text{C}$ a la $T_{ma}$

Fuente: FAGUNDO y GONZÁLEZ. 2000. P. 4

Realizado por: MACAS, P. 2015.



2. En relación con la llamada Temperatura Indiferente del Organismo: Esta clasificación es considerada la más aceptada universalmente. (FAGUNDO et al., 2001, p. 4)

**Tabla 2-1:** Clasificación de las aguas desde el punto de vista hidroterápico

<b>Tipo</b>	<b>Descripción</b>
Hipo-termales	$T < 4^{\circ}\text{C}$ a la Tma
Orto-termales	$T = Tma$
Hiper-termales	$T > 4^{\circ}\text{C}$ a la Tma

Fuente: FAGUNDO y GONZÁLEZ. 2000, p. 5

Realizado por: MACAS, P. 2015.

#### **1.4.2** *Clasificación de las aguas según los valores de presión osmótica*

Esta clasificación se basa en los valores de la presión osmótica de las aguas con relación a la de los fluidos orgánicos. Según Karakolev (1987), el estado isotónico se alcanza con una mineralización, de 13 \$g/l\$. Por lo que la mayoría de las aguas minerales son hipotónicas. De acuerdo a su tonalidad, este especialista clasifica las aguas minerales de la siguiente manera:

**Tabla 3-1:** Clasificación de las aguas según la presión osmótica

<b>Tipo</b>	<b>Descripción</b>
Hipo-termales	$< 300$ mmol/L
Orto-termales	$=300$ mmol/L
Hiper-termales	$> 300$ mmol/L

Fuente: FAGUNDO y GONZÁLEZ. 2000. p. 5

Realizado por: MACAS, P. 2015.

#### **1.4.3** *Clasificación de las aguas según la mineralización de las aguas*

Esta clasificación se basa en la mineralización total predominante y especial que contengan las aguas. Se consideran predominantes a los cationes, aniones y gases que presenten más del 20 % de la masa iónica correspondiente, expresada en mili-equivalentes. Según este criterio las aguas se clasifican de la siguiente manera:

1. Aguas con más de un gramo por litro de sustancias mineralizantes: Dentro de este grupo tenemos los siguientes tipos de aguas:
  - a) Sulfatadas: Estas aguas contienen más de 1 g/L de sustancias mineralizantes, en las cuales predomina el ion sulfato. En la composición de estas aguas también se encuentra la presencia de iones como sodio, bicarbonato, cloruro y magnesio los cuales influyen en las propiedades terapéuticas de las mismas. (FAGUNDO, J., 2014, p. 4)
  - b) Cloruradas: Aguas con más de 1 g/L de sustancias mineralizantes, en las cuales el ion cloruro suele ir acompañado de sodio en cantidades semejantes, este tipo de composición de las aguas indica que fluyen desde orígenes profundos donde la existencia de fallas y grietas facilita su salida a la superficie. Este tipo de aguas se subdividen en: fuertes (más de 50 g/L), medianas (entre 10 y 50 g/L) y débiles (menos de 10 g/L). (FAGUNDO, J., 2014, p. 4)
  - c) Bicarbonatadas: Aguas con más de 1 g/L de sustancias mineralizantes, en las cuales el ion bicarbonato se encuentra acompañado de sodio, cloruro, calcio, magnesio, otros. Este tipo de aguas también se las llama carbónicas o carbogaseosas cuando tienen en gran cantidad ácido libre como CO<sub>2</sub> en cantidad mayor a 250 mg/L. (FAGUNDO, J., 2014, p. 4)
2. Aguas con mineralización inferior a un gramo por litro: Estas aguas contienen una mineralización inferior a 1 g/L, por lo que se las conoce como aguas oligominerales. (FAGUNDO, J., 2014, p. 4)
  - a) Según la cantidad de mineralización: Este tipo de aguas contienen una mineralización menor a 1 g/L, pero pueden contener una cantidad abundante de microelementos como: germanio, vanadio, molibdeno, cobalto, silicio, fósforo, etc. Según este criterio se subdividen en: aguas de débil mineralización (menos de 0.2 g/L) y otra de mediana mineralización (0.2-1 g/L), pero sin considerárseles factores mineralizantes especiales. (FAGUNDO, J., 2014, p. 5)
  - b) Según factores mineralizantes especiales: Este tipo de aguas se subdividen atendiendo a su temperatura de la siguiente manera: acratopegas (con menos de 20 °C) y acratotermas (con más de 20 °C). (FAGUNDO, J., 2014, p. 5)
3. Aguas con componentes especiales reconocidos por su actividad biológica en determinadas proporciones: Esta clasificación se basa en la actividad biológica que poseen determinados componentes los cuales deben estar en cantidades establecidas por las normas. Se clasifican de la siguiente manera: (FAGUNDO, J., 2014, p. 5)

**Tabla 4-1:** Clasificación del agua mineral según componentes

<b>TIPO</b>	<b>DESCRIPCION</b>
Sulfuradas	También llamadas sulfhídricas, contienen más de 1 mg=L de sulfuro de hidrogeno o ion sulfhídrico. La proporción en la que se encuentran estos dos componentes va a depender del pH, en donde, mientras el pH sea inferior a 7.5 prevalecerá el sulfuro de hidrógeno y a valores mayores prevalecerá el ion sulfhídrico.
Carbogaseosas	con una cantidad de CO <sub>2</sub> superior a 250 mg=L.
Silícicas	con una cantidad de SiO <sub>2</sub> superior a 50 mg=L.
Arsénicas	con un contenido de As entre 0.2-0.3 mg=L.
Bóricas	con un contenido de Ba superior a 4 mg=L.
Fluóricas	con un contenido de F- entre 1.0-2.0 mg=L.
Brómicas	con un contenido de Br- superior a 4 mg=L.
Yodhídricas	con un contenido de I- superior a 1 mg=L.
Líticas	con un contenido de Li superior a 1 mg=L.
Estróncicas	con un contenido de Sr superior a 10 mg=L.
Báricas	con un contenido de Ba superior a 5 mg=L.
Ferruginosas	Estas aguas contienen más de 5 g/L de sustancias mineralizantes, de las cuales el hierro se encuentra en su forma reducida y puede encontrarse en concentraciones de más de 5 g=L
Radónicas	con contenidos de radón (Rn) mayor de 1.82 nCi=L.

Fuente: FAGUNDO J., 2014, p. 5  
Realizado por: MACAS, P. 2015.

#### **1.4.4 Clasificación de las aguas según sus usos**

Atendiendo a este criterio, las aguas se pueden clasificar en: mineral natural, mineral medicinal, mineral termal y mineral industrial. (FAGUNDO y GONZÁLEZ. 2000, p. 5)

#### **1.5 Beneficios del tratamiento con aguas termales**

Los beneficios que aportan los baños en aguas termales son variados. En la guía desarrollada por Termalsalud.com se describen algunos de los beneficios que aportan las aguas termales a la salud, como son: producen una sensación de bienestar, no se contradicen con terapias habituales, casi no poseen efectos indeseables, estimula la circulación periférica, relaja los músculos, facilita la actividad cardiorrespiratoria, previene enfermedades comunes, detiene procesos crónicos dolorosos, actúa en enfermedades crónicas y se usa en estética.

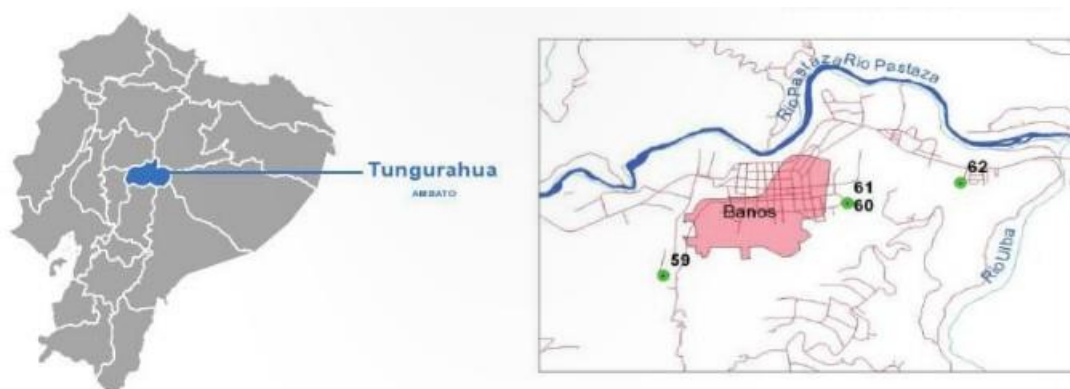
## 1.6 Aguas termo-minerales de Baños de agua Santa

Baños de Agua Santa es un cantón que pertenece a la provincia de Tungurahua, se encuentra a una altura de 1.826 metros msnm, con una temperatura promedio de 20°C. Posee una población de 20.000 habitantes, y está ubicado en un valle a lado del volcán Tungurahua. (BAÑOS, 2010)

Baños de Agua Santa es una de las principales ciudades turísticas del Ecuador y su principal atractivo son los balnearios de aguas termales que tienen la fama de poseer propiedades curativas para diversas enfermedades, entre las cuales podemos destacar las enfermedades reumáticas crónicas, enfermedades respiratorias leves, etc. (NAPOLEON et al., 2013)

La ciudad posee cinco balnearios municipales con aguas minerales y sulfurosas que tienen temperaturas que van desde los 18°C para las aguas frías hasta las hirvientes de 55°C. Todas estas aguas emergen de las entrañas y deshielos del volcán Tungurahua. (NAPOLEON et al., 2013)

Las cinco fuentes termales que hay en Baños son las siguientes: termas “la Virgen”, termas “El Salado”, Balneario “Santa Ana”, Balneario “Las Peñas o Modernas”, Santa Clara o El Cangrejo con piscina semi-olímpica. (NAPOLEON et al., 2013)



**Figura 1-1:** Mapa de ubicación del Balneario “Santa Ana” (Baños-Tungurahua)

Fuente: Datos de mapas de Google 2014

### 1.6.1 Aguas termo-minerales del Balneario Ecológico “Santa Ana”

Las termas de Santa Ana se encuentran ubicadas en la av. Amazonas y s/n. Posee aguas frías con una temperatura de 22°C y aguas calientes con una temperatura de 35°C. Las aguas termales de Balneario Ecológico “Santa Ana”, son de tipo sulfatadas, magnésicas e hipertermales. (NAPOLEÓN, B, 2013)

## **1.7 Microorganismos presentes en las aguas termo-minerales**

Existen microorganismos que tienen como hábitat las aguas termo-minerales, a estos se los suele llamar “microorganismos autóctonos”. También pueden existir a más de los microorganismos autóctonos, otros que son producto de contaminación del agua con sustancias del medio externo que se denominan microorganismos alóctonos. (DE LA ROSA. 2004, p. 521)

### ***1.7.1 Microorganismos Autóctonos***

Estos microorganismos son aquellos que presentan una asociación estable con un medio determinado y forma parte integral de la microbiota de ocupación y desarrolla una función demostrable en el ecosistema de que se trate. (DE LA ROSA. 2004, p. 522)

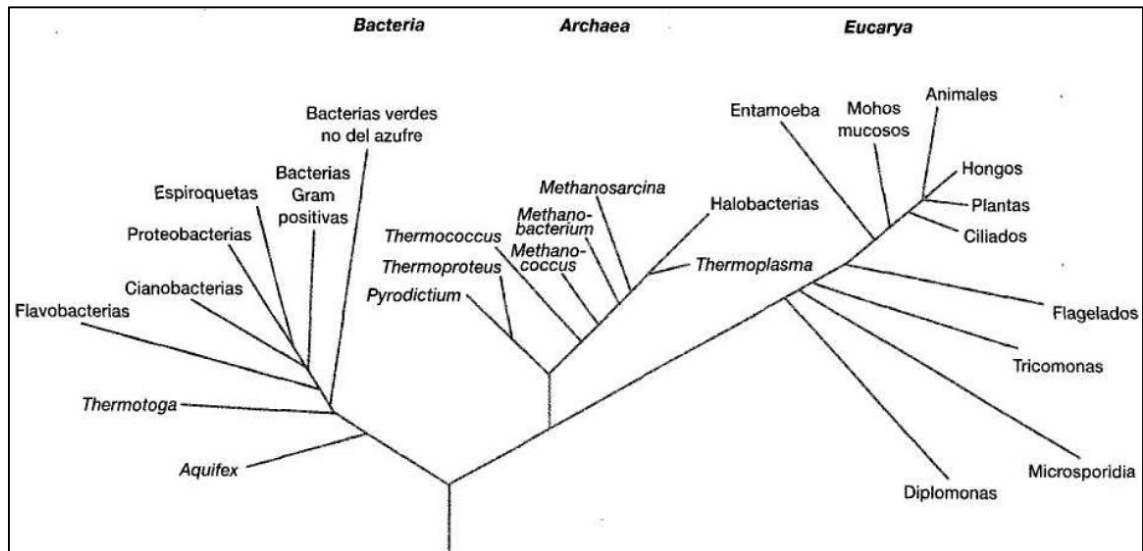
### ***1.7.2 Microorganismos Alóctonos***

Estos microorganismos no son propios de medio, proceden de ambientes externos y permanecen transitoriamente en el medio por un corto o largo plazo, dependiendo del desarrollo en dicho medio. Estos microorganismos suelen considerarse como contaminantes. (DE LA ROSA. 2004, p. 523)

## **1.8 Taxonomía microbiana**

Los microorganismos han venido evolucionando desde hace millones de años, hoy en día existe una gran diversidad microbiana, que se divide según el árbol filogenético universal en tres grupos principales denominados dominios: *Bacteria*, *Archaea* y *Eucarya*, de la siguiente manera:

La estructuración jerárquica de la taxonomía bacteriana en orden descendente es la siguiente: *phyla*, clase, orden, familia, género y especie. En organismos superiores de cierta manera es fácil identificar la especie a la que pertenecen, pero en el caso de las especies procariotas resulta más complicado porque su reproducción es asexual y se las caracteriza por sus diferencias fenotípicas y genotípicas. (FASEB, J. 1993, p. 113)



**Figura 2-1:** Árbol filogenético universal. Dominios: *Bacteria*, *Archaea* y *Eucarya*

Fuente: FASEB, J, 1993, p. 113

### 1.8.1 Género

Luego de especie, el siguiente rango en la jerarquía taxonómica es el género, que se lo define como un conjunto claramente definido de una o varias especies y que se encuentra separado de otros géneros. (PRESCOTT, 2010, p. 455)

### 1.8.2 Especie

La definición más aceptada propuesta por taxonomistas bacterianos dice que: “Una especie es una colección de cepas que tienen una Composición de G + C similar a una similitud de un 70 % o superior en base a experimentos de hibridación de DNA”. De manera sencilla se puede decir que una especie es un conjunto de cepas, que poseen varias propiedades constantes y que se diferencian significativamente de otras cepas. (PRESCOTT, 2010, p. 456)

### 1.8.3 Cepa

Las cepas son poblaciones de organismos que proceden de un único organismo, estas cepas se las obtiene de aislamientos de cultivos puros. (PRESCOTT, 2010, p. 456)

#### **1.8.4 Clasificación de los microorganismos**

Se puede agrupar a los microorganismos de formas diferentes: 1) tomando en cuenta las similitudes globales constituyendo un sistema fenético y 2) tomando en cuenta posibles relaciones evolutivas constituyendo un sistema filogenético”. (PRESCOTT, 2010, p. 458)

La clasificación fenética se basa en juntar organismos comparando rasgos en función de sus características fenotípicas para estimar una semejanza general, esto se logra comparando el mayor número posible de atributos. La Clasificación filogenética se basa en la evolución de las especies microbianas con especial interés en la comparación del rRNA”. (PRESCOTT, 2010, p. 460)

### **1.9 Bacterias**

Las bacterias son microorganismos procariotas, es decir que en lugar de un núcleo verdadero tienen una región nuclear, la cual se diferencia del citoplasma por carecer de ribosomas y que además no está rodeada por una membrana.

#### **1.9.1 Clasificación de las bacterias**

La clasificación de las bacterias es un proceso de visión de los microorganismos en grupos. Las bacterias se pueden clasificar en base a diversos criterios, como la estructura celular, el metabolismo o también puede clasificarse basándose en la diferencia de determinados componentes que estas poseen como ácidos grasos, ADN, pigmentos, antígenos o quinonas. (JULIO, V. 2010, p. 23)

Este tipo de clasificación basado en las diferencias de las bacterias a pesar de permitir la identificación de cepas bacterianas, aún no está claro si dichas diferencias representan distintas especies bacterianas, esto se debe a la ausencia de estructuras distintivas en la mayoría de las bacterias y a la transferencia horizontal de genes entre especies diferentes, lo que supone que bacterias muy relacionadas puedan llegar a presentar morfologías y metabolismos muy diferentes. (MENDEZ, L. 2012)

**Tabla 5-1:** Clasificación de las bacterias

<b>TIPO</b>	<b>DESCRIPCIÓN</b>
Por su forma	Las bacterias se clasifican en este grupo, de acuerdo a su morfología en cocos, bacilos, espirilos y vibrios.
De acuerdo a su afinidad tintorial	Con ayuda de la tinción Gram, las bacterias se clasifican en Gram positivas y Gram negativas.
Por su forma de respiración	De acuerdo a este criterio las bacterias se clasifican en aerobias y anaerobias estrictas, aerobias y anaerobias facultativas, y
Por su metabolismo	Tomando en cuenta este criterio se las bacterias se clasifican según la fuente de carbono en heterótrofas y autótrofas, según la fuente de energía en fototrofas y quimiotrofas, según los donadores de electrones en litotrofas y organotrofas.
Por relaciones inter-específicas	Según este criterio las bacterias se clasifican en parásitas y comensales.
Por su taxonomía genética	Según este criterio se clasifica las bacterias por afinidad en el ADN, en donde si dos bacterias poseen 100 % de genes en común, son de la misma especie.

Fuente: FAGUNDO y GONZÁLEZ. 2000, p. 5

Realizado por: MACAS, P. 2015.

### **1.9.2 Género *aeromonas***

Las bacterias pertenecientes a este género, tienen como hábitat el suelo, el agua dulce y salada, posee 14 genomoespecies y está dividido en dos grupos: psicrófilico y mesófilico. Las especies de *Aeromonas* son patógenos que pueden producir enfermedades a los humanos como: gastroenteritis, infecciones de heridas, septicemia y otras infecciones. (KONEMAN, E., et al. 2008, p. 1693).

### **1.9.3 Género *Falvobacterium***

Los microorganismos pertenecientes a este género son bacilos Gram negativos, con producción de catalasa y oxidasa. Tienen como hábitat el suelo, agua dulce e incluso de mar. Algunas especies de *Flavobacterium* son patógenas para los animales y los seres humanos. La especie más conocida *Flavobacterium meningosepticum* es patógena para el ser humano, produciendo meningitis. Las especies *Flavobacterium psychrophilum*, *Flavobacterium branchiophilum* y *Flavobacterium columnare* son causantes de enfermedades en los peces. (GACÍA, V. 2000, p. 87).



**Tabla 6-1:** Clasificación de las *Aeromonas*

Grupo	Especies de <i>Aeromonas</i>
Psicrofílico	<i>A. hydrophyla</i>
Mesofílico	<i>A. caviae</i>
	<i>A. media</i>
	<i>A. eucrenophila</i>
	<i>A. veronii</i>
	<i>A. jandaei</i>
	<i>A. trota</i>
	<i>A. schubertii</i>
	<i>A. encheleia</i>
	<i>A. allosaccharophila</i>
	<i>A. sobria</i>
	<i>A. popoffii</i>
	<i>A. bestiarum</i>
	<i>A. salmonicida</i>

Fuente: KONEMAN, E. 2008, p. 1694

Realizado por: MACAS, P. 2015.

#### **1.9.4 Género *Shewanella***

Los microorganismos pertenecientes a este género son bacilos Gram negativos, oxidasa positiva. Tienen como hábitat el agua dulce, de mar e incluso se han aislado de muestras Clínicas humanas. La especie mayormente aislada en humanos es *Shewanella algae* y la especie aislada mayormente en no humanos es *Shewanella putrefaciens*. Los microorganismos pertenecientes al género *Shewanella* son sensibles a la mayoría de antibióticos excepto para penicilina y cefelotina. (MACFADDIN, J. 2000, p. 344).

#### **1.9.5 Género *Bacillus***

Los microorganismos pertenecientes a este género son bacilos Gram positivos que forman endosporas. Tienen como hábitat el suelo, agua dulce e incluso de mar. Existen algunas especies de *Bacillus* que son patógenas para el ser humano, por ejemplo *Bacillus cereus* que produce toxiinfección alimentaria. (KONEMAN, E., et al. 2008, p. 56).

#### **1.9.6 Género *Staphylococcus***

Los microorganismos pertenecientes a este género son cocos Gram positivos, redondos aerobios y anaerobios facultativos. Estos microorganismos se encuentran formando parte de la flora normal del cuerpo humano, en la mucosa nasal cavidad oral, piel y en el intestino grueso.

Las especies más importantes de este género son: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus saprophyticus* y son patógenas para el ser humano, ya que se relacionan con infecciones cutáneas, del tracto respiratorio, osteomielitis, etc. (GARCÍA, et al. 1993, p. 87).

## **1.10 Análisis microbiológico de las aguas termo-minerales**

El análisis microbiológico de las aguas termo-minerales se realiza para para identificar la microbiota autóctona que estas poseen, entre los análisis que se realizan están, el recuento e identificación de: bacterias aerobias mesófilas, coliformes totales y fecales, estafilococos y mohos y levaduras. (ALVAREZ, M., et al. 1995, p.325).

### **1.10.1 Bacterias aerobias mesófilas**

Se denominan así las bacterias heterótrofas aerobias y anaerobias facultativas, mesófilas y psicotróficas, estas bacterias se suelen cultivar en medios de cultivo en laboratorio ya que reflejan la calidad sanitaria de la materia en estudio aunque no existe relación n directa entre la flora aerobia y la posible presencia de microorganismos patógenos. (ALVAREZ, M., et al. 1995, p. 315).

### **1.10.2 Staphylococcus**

Las bacterias del género *Staphylococcus* forman parte importante en la identificación de microorganismos, debido a que muchas de las especies son patógenas para el ser humano, y reflejan la calidad sanitaria del agua. Estos microorganismos se encuentran formando parte de la flora normal del cuerpo humano. (ALVAREZ, M., et al. 1995, p. 325).

### **1.10.3 Mohos y levaduras**

Los hongos son estructuras que generalmente se los conceptúa como vegetales pertenecientes al grupo de los talofitas, Los hongos están considerados como un organismo cenocítico, están constituidos por filamentos individuales, formados por células alineadas en una sola serie que se denominan hifas. Los mohos son hongos multicelulares filamentosos, que poseen un micelio verdadero. Las levaduras son hongos que crecen en forma de agregados sueltos de células independientes. (GARCÍA, 2009, p. 86)

Los hongos están constituidos por filamentos tubulares ramificados que se entrecruzan denominados hifas, y un conjunto de estas recibe el nombre de micelio. Las hifas de un hongo se pueden clasificar de acuerdo a su función en hifas vegetativas y fértiles, de acuerdo a su posición en el medio en sumergidas o aéreas. Los hongos se pueden clasificar tomando en cuenta la estructura de sus hifas en septados y no septados. (GARCÍA, 2009, p. 86)

Las levaduras están agrupadas en 350 especies que se encuentran clasificadas en 39 géneros. Las levaduras presentan diversas formas como son ovoide, alargada, esférica, forma de pera o limón e incluso triangulares. (MACFADDIN, J. 2000, p.400).

#### ***1.10.4 Coliformes totales y fecales***

Los coliformes totales y fecales son considerados generalmente como microorganismos indicadores de posible contaminación y sirven para medir la calidad del agua. Los coliformes totales son bacterias Gram negativas, de morfología bacilar, aerobias o anaerobias facultativas, no formadoras de endosporas, oxidasa negativa, fermentadora de la lactosa con producción de ácido y gas. Los coliformes fecales son las bacterias coliformes totales que están relacionadas con la contaminación con desechos fecales. (MACFADDIN, J. 2000, p. 400).

### **1.11 Medios de cultivo**

Un medio de cultivo es un medio artificial sólido líquido que sirve de soporte para el crecimiento de las bacterias fuera de su hábitat. Los medios de cultivo son mezclas complejas de sustancias, que ofrece los elementos necesarios para el crecimiento y multiplicación de microorganismos, permitiendo obtener poblaciones de bacterias en laboratorio. (MACFADDIN, J. 2000, p. 300).

Los medios de cultivo se preparan de acuerdo con las recomendaciones del fabricante, y generalmente se empieza disolviéndolos en agua destilada, luego se los calienta a ebullición para una disolución completa. La mayoría de medios requiere de una esterilización para que solo crezcan las bacterias de interés. (MACFADDIN, J. 2000, p. 300).

#### ***1.11.1 Clasificación de los medios de cultivo***

Los medios de cultivo se pueden clasificar según el fin al que estén destinados, en: medios selectivos, medios de enriquecimiento, medios de diferenciación, medios de identificación, medios de multiplicación, medios de conservación. (ALVAREZ, M., et al. 1990, p. 111)

Los medios de cultivo selectivos son utilizados para inhibir el crecimiento de microorganismos presentes en la muestra y que no se desean aislar. Los medios de cultivo de enriquecimiento se utilizan para beneficiar el crecimiento de bacterias que se encuentran en menor cantidad en una mezcla de varios tipos de microorganismos. (ALVAREZ, M., et al. 1990, p. 111)

Los medios de cultivo de diferenciación son utilizados para exponer a ciertas bacterias que se encuentran en una mezcla de varios grupos microbianos, mediante una reacción bioquímica a la que resultan positivas de entre las demás, y permite su diferenciación. Los medios de cultivo de identificación son utilizados para investigar un solo tipo de microorganismo frente a un determinado sustrato, en este medio se debe sembrar bacterias aisladas puras. (ALVAREZ, M., et al. 1990, p. 111)

Los medios de cultivo de multiplicación, ofrecen los recursos necesarios para lograr un rápido crecimiento microbiano en un mínimo de tiempo. Los medios de conservación son usados para el mantenimiento de microorganismos, en la actualidad este tipo de medios han sido remplazados por la liofilización. Una variación de los medios de conservación, son los medios de transporte, los cuales sirven para trasladar de lugar a una muestra manteniéndola en estado viable, pero sin reproducción. (ALVAREZ, M., et al. 1990, p. 111)

### ***1.11.2 Placas 3M Petrifilm***

Las placas 3M Petrifilm son medios de cultivo que ayudan en la determinación y conteo rápido de microorganismos. En la actualidad existe una gran cantidad de productos que requieren de estudios microbiológicos para asegurar la salud de la población que los consume. Con las placas 3M Petrifilm se realizan determinaciones microbiológicas más rápidas y eficientes que con los métodos tradicionales.

Existen placas 3M Petrifilm específicas para una variada gama de microorganismos como son: recuento de aerobios totales, recuento de E.coli/Coliformes totales, placa de recuento Staph Express y recuento de mohos y levaduras. La realización de un análisis generalmente consta de: siembra, incubación e interpretación.

La utilización de estas placas a más de las facilidades mencionadas, proporciona mayor confianza en los resultados ya que es un método utilizado mundialmente y es aprobado por múltiples organismos como: Association of Official Analytical Chemists, Asociación Francesa De Normalización, U.S. Grade a Pasteurized Milk Ordinance, Canada-Health Protection Branch HPB (Compendium Of Analytical Methods) y Australia, New South Wales Dairy Test Manual.

### ***1.11.3 Agar Mueller Hinton***

El agar Mueller Hinton es un medio de cultivo no selectivo. Este medio se usa con frecuencia en la realización de pruebas de sensibilidad a los antibióticos o antibiograma, ya que los microorganismos se desarrollan adecuadamente y ofrece una buena reproducibilidad lote a lote. Cuando se adiciona suplementos como sangre, permite realizar pruebas de sensibilidad en microorganismos más exigentes como los estreptococos. (ALVAREZ, M., et al. 1990, p. 111)

### ***1.11.4 Agar Eosina Azul de Metileno***

El Agar Eosina Azul de Metileno también denominado E.A.M, es un medio selectivo utilizado para el aislamiento de enterobacterias y otras especies de bacilos Gram negativos. La presencia de los indicadores de eosina y azul de metileno inhibe en la mayor parte el crecimiento de las bacterias Gram positivas, además de facilitar la diferenciación entre las bacterias capaces de utilizar lactosa y/o sacarosa y las que son incapaces de hacerlo. (FORBES, B. 2007, p. 86).

### ***1.11.5 Agar Manitol Salado***

El Agar Manitol Salado es un medio de cultivo selectivo y diferencial, utilizado para el aislamiento y diferenciación de estafilococos. Este medio contiene una alta concentración salina, y los estafilococos crecen en altas concentraciones de sal por lo que crecen en este medio, y pueden o no fermentar el manitol. (ALVAREZ, M., et al. 1990, p. 200)

### ***1.11.6 Agar MacConkey***

El Agar MacConkey es un medio de cultivo diferencial, utilizado para el aislamiento de bacterias Gram negativas, aerobios y anaerobios facultativos. Este medio contiene una mezcla de sales biliares y cristal violeta que inhibe el crecimiento de bacterias Gram positivas. Los microorganismos cultivados en este medio, pueden ser o no fermentadores de la lactosa y dependiendo de esto tomaran sus propias características. (ALVAREZ, M., et al. 1990, p. 150)

### ***1.11.7 Agar Kligler***

El Agar Kligler o también denominado KIA, es un medio de cultivo diferencial en tubo, utilizado para la determinación de fermentación de los hidratos de carbono lactosa y glucosa, y para determinar la producción de ácido sulfhídrico de las bacterias analizadas. Los microorganismos cultivados en este medio deben proceder de cepas puras. (MACFADDIN, J. 2000. P.458)

### ***1.11.8 Agar SIM***

El Agar SIM, es un medio de cultivo semisólido en tubo, utilizado para determinar si un microorganismo es móvil o no, la producción de indol y ácido sulfhídrico. Los microorganismos cultivados en este medio deben proceder de cepas puras. (ALVAREZ, M., et al. 1990, p. 21)

### ***1.11.9 Agar Urea***

El Agar Urea es un medio de cultivo diferencial, utilizado para detectar a las bacterias que hidrolizan la urea. Los microorganismos cultivados en este medio deben proceder de cepas puras. (ALVAREZ, M., et al. 1990, p. 210)

### ***1.11.10 Agar de citrato de Simmons***

El Agar de citrato de Simmons es un medio de cultivo diferencial de enterobacterias, utilizado para determinar si el microorganismo estudiado tiene la capacidad de utilizar solamente citrato como fuente de carbono. Los microorganismos cultivados en este medio deben proceder de cepas puras. (ALVAREZ, M., et al. 1990, p. 120)

### ***1.11.11 Medio basal OF de Hugh y Leifson***

El Medio basal OF de Hugh y Leifson es un medio de cultivo utilizado para identificar el metabolismo oxidativo/fermentativo, movilidad y producción de gas de las bacterias Gram negativas estudiadas. (MACFADDIN. 2000, p.344)

### ***1.11.12 Agar almidón***

El agar almidón es un medio de cultivo sólido, utilizado para identificar la capacidad de las bacterias estudiadas de hidrolizar el almidón. Los microorganismos cultivados en este medio deben proceder de cepas puras. (MACFADDIN. 2000, p. 245)

### ***1.11.13 Agar gelatina***

El agar gelatina es un medio de cultivo sólido, utilizado para determinar la capacidad de las bacterias de hidrolizar la gelatina por acción de enzimas proteolíticas o gelatinasas. Los microorganismos cultivados en este medio deben proceder de cepas puras. (MACFADDIN. 2000, p. 265)

## **1.12 Identificación de microorganismos**

Para la identificación de microorganismos se requiere de una serie de métodos y técnicas, que nos van facilitar el aislamiento de un cultivo puro, para la identificación del mismo por medio de una serie de pruebas microbiológicas, las cuales nos pueden ayudar a elucidar la familia, género y especie del microorganismo investigado.

### ***1.12.1 Inoculación y aislamiento de bacterias***

El material que se inocula, se denomina inóculo. El aislamiento de bacterias se realiza inoculando un medio de cultivo generalmente utilizando el método de “siembra por estría cruzada en placa”, donde las células microbianas quedan separadas y en un lapso de 18 a 24 horas, produciéndose masas visibles llamadas colonias. Cada colonia que se observe diferente presumiblemente será un cultivo puro. La siembra por estría en placa permite aislar bacterias que dan paso a colonias separadas y que transfiriéndolas a un nuevo medio de cultivo, permite el desarrollo de cultivos bacterianos puros. (ALARCÓN, L., et al. 2004, p. 14)

### ***1.12.2 Repiques***

Los repiques se realizan para mantener las bacterias frescas antes de realizar los análisis microbiológicos, además de ayudar en el proceso de purificación de las cepas bacterianas. Esta prueba se realiza tomando una pequeña porción de la colonia con la punta de un asa o palillo estéril e inoculando en un nuevo medio de cultivo.

### ***1.12.3 Cultivo puro de bacterias***

Un cultivo puro es aquel que contiene un solo tipo de microorganismo. Existen numerosas técnicas de aislamiento, pero la mayoría utilizan medios de cultivo sólidos, sobre los cuales se desarrollan las colonias macroscópicas. Este tipo de cultivos son esenciales para realizar estudios sobre las propiedades de un microorganismo concreto. (GAMAZO, C., et al. 2015, p. 126)

#### ***1.12.4 Descripción macroscópica***

La morfología macroscópica es el estudio de la forma y estructura que poseen las colonias bacterianas, este tipo de identificación de microorganismos está basado en criterios fenotípicos, que se fundamentan en la observación de características físicas y/o metabólicas, y aporta datos preliminares que ayudan a determinar el tipo de procedimientos que se van a seguir para la identificación. (FORBES, B. 2009, P. 80)

Las características de cada colonia están en función del medio de cultivo en el que se desarrolle, el cual tiene que ser sólido, en donde se siembran los microorganismos ya sea en estría en placa o en tubo con agar inclinado. (FORBES, B. 2009, P. 80)

Los aspectos que se observan en cada colonia son: Tamaño, forma, superficie, consistencia, color, Elevación, bordes y otras características importantes al momento de elegir un método de identificación. (FORBES, B. 2009, P. 80)

#### ***1.12.5 Preparación y tinción de las muestras***

Generalmente se pueden observar directamente los microorganismos en el microscopio, pero es necesario fijarlos y teñirlos, para lograr una mejor resolución y aumentar las características morfológicas propias de cada microorganismo.

##### ***1.12.5.1 Tinción Gram***

Es una prueba rápida y sencilla que se utiliza para clasificar a las bacterias como Gram positivas de color rojo y Gram negativas de color violeta. En esta prueba se emplea un colorante (violeta), un fijador del colorante (yodo), un decolorante (alcohol), y otro colorante (safranina), para teñir a las bacterias. (MURRAY, P., et al. 2006, p. 25)

Esta tinción permite clasificar a las bacterias en Gram positivas y Gram negativas, gracias a la estructura de la pared bacteriana, que en las bacterias Gram positivas es una gruesa capa de peptidoglicano con varios enlaces cruzados de ácido teicoico, que la hace más resistente a la decoloración con alcohol, y en las células Gram negativas la pared bacteriana posee una capa de peptidoglicano más delgada por lo que se decolora con mayor facilidad con alcohol. (FORBES, B. 2009, P. 87)



### ***1.12.6 Pruebas bioquímicas***

Las pruebas bioquímicas son distintos test químicos que ayudan a determinar la actividad metabólica de un microorganismo y poder clasificarlo e identificarlo. Para la realización de estas pruebas es necesario haber aislado la muestra previamente.

### ***1.12.7 Prueba de catalasa***

Esta prueba se realiza para detectar la presencia de la enzima catalasa en las bacterias analizadas o para diferenciar los géneros entre ellas. La enzima catalasa se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias. Para realizar esta prueba se necesita peróxido de hidrógeno el cual se descompone por acción de la catalasa en agua y oxígeno. (MACFADDIN. 2000, p.344)

### ***1.12.8 Prueba de oxidasa***

Esta prueba se realiza para detectar la presencia de enzimas oxidasas en las bacterias analizadas o para diferenciar los géneros entre ellas. La mayoría de microorganismos oxidasa positivos son aerobios o anaerobios facultativos.

### ***1.12.9 Prueba de oxidación-fermentación***

Esta prueba se utiliza para determinar el metabolismo oxidativo o fermentativo de un carbohidrato o su falta de utilización, movilidad y producción de gas de las bacterias Gram negativas, para la realización de esta prueba se utiliza el medio basal OF de Hugh y Leifson. (MACFADDIN. 2000, p. 354)

Esta prueba se realiza en dos tubos rectos que contienen el medio basal semisólido OF de Hugh y Leifson de color azulado, este medio generalmente contiene glucosa como sustrato y posee un indicador ácido-base azul de bromotimol que detecta la acumulación de ácidos. (MACFADDIN. 2000, p. 354)

Las bacterias se inoculan con ayuda de una aguja por picadura en los dos tubos, posteriormente se incuban a 37°C durante 24 horas, uno en condiciones de aerobiosis y otro en condiciones de anaerobiosis, para lo cual se utiliza parafina o vaselina. (MACFADDIN. 2000, p. 354)

La prueba será positiva para las bacterias con metabolismos oxidativo, si existe cambio de color de azul verdoso a amarillo en el tubo incubado en condiciones de aerobiosis y para las bacterias con metabolismo fermentativo, si existe cambio de color de azul verdoso a amarillo en el tubo incubado en condiciones de anaerobiosis. En el medio también se puede observar en caso de existir la movilidad y producción de gas de las bacterias. (MACFADDIN. 2000, p. 355)

#### ***1.12.10 Prueba de hidrólisis de la gelatina***

Esta prueba se realiza sobre los microorganismos, para determinar su capacidad de producir enzimas proteolíticas o proteinasas que hidrolicen a la gelatina. Para la realización de esta prueba se utiliza el medio de cultivo agar almidón. (MACFADDIN. 2000, p. 160)

La gelatina es una proteína derivada del colágeno, muy grande para entrar en la célula bacteriana. Existen bacterias que tienen la capacidad de segregar sustancias exocelulares, como las gelatinasas, que degradan las proteínas convirtiéndolas en componentes más pequeños asimilables para la bacteria. (MACFADDIN. 2000, p. 161)

La hidrólisis de la gelatina por parte de las gelatinasas se da en dos pasos, y el resultado final es una mezcla de sus aminoácidos constitutivos, asimilables para la célula bacteriana, y la pérdida de las propiedades gelificantes. Para determinar macroscópicamente este proceso se utiliza el reactivo de cloruro mercuríco. (MACFADDIN. 2000, p. 162)

Esta prueba se puede realizar en agar en placa, donde se inoculan las bacterias procedentes de un cultivo puro, con ayuda de un asa de platino, estriando sobre la superficie del agar, se incuba a 37°C por 8 días. Cuando las bacterias ya tienen un crecimiento óptimo se recubre la superficie del agar con algunas gotas de cloruro mercurico. La prueba es positiva en caso de existir la formación de una zona clara alrededor de la colonia. (MACFADDIN. 2000, p. 162)

#### ***1.12.11 Prueba de hidrólisis del almidón***

Esta prueba se realiza sobre las bacterias para determinar su capacidad de hidrolizar el almidón por medio de la enzima  $\alpha$ -amilasa. Para la realización de esta prueba se utiliza el medio de cultivo agar almidón. (MACFADDIN. 2000, p. 385)

El almidón está compuesto por la unión de amilopectina y amilosa. La hidrólisis del almidón se da en las uniones  $\alpha$ -1,4-acetal y  $\alpha$ -1,6-acetal, que son las que mantienen unido el polímero de almidón. La enzima  $\alpha$ -amilasa, degrada en su totalidad al compuesto amilosa. (MACFADDIN. 2000, p. 385)

El reactivo de solución de yodo acuoso de Lugol, se combina con los compuestos de amilosa y amilopectina. El compuesto de amilosa se une fuertemente con más yodo y forma un complejo de color azul intenso, donde las moléculas de yodo se encuentran atrapadas dentro de la hélice de unidades de glucosa de la cadena de amilosa. Al producirse la hidrólisis del almidón la hélice de la cadena de amilosa se desintegra y el color azul se pierde. (MACFADDIN. 2000, p. 386)

Esta prueba se puede realizar en agar en placa, donde se inoculan las bacterias con ayuda de un asa de platino, estriando sobre la superficie del agar, se incuba a 37°C por 8 días. Cuando las bacterias ya tienen un crecimiento óptimo se añade 3 gotas de solución de yodo acuoso de Lugol. La prueba es positiva en caso de existir la formación de una zona clara alrededor de la colonia. (MACFADDIN. 2000, p. 386)

#### ***1.12.12 Prueba en agar con hierro de kligler***

Esta prueba se realiza sobre bacterias Gram negativas, para diferenciar a los miembros de la familia Enterobacteriaceae. Esta prueba sirve para determinar la capacidad de las bacterias de fermentar hidratos de carbono, producir gas y ácido sulfhídrico. Para la realización de esta prueba se utiliza el medio de cultivo Kligler. (MACFADDIN. 2000, p. 223)

El medio de cultivo Kligler posee dos hidratos de carbono que son la glucosa y la lactosa. Las bacterias pueden fermentar: ambos hidratos de carbono, que se evidencia en el pico de flauta y en el fondo del tubo; solo la glucosa, que se evidencia en el fondo del tubo; ninguno de los dos con o sin producción de gas y de ácido sulfhídrico. (MACFADDIN. 2000, p. 223)

La prueba se realiza en un tubo con pico de flauta, donde se inoculan las bacterias con ayuda de una aguja, por punción del fondo y estriando en el pico de flauta, se incuba a 37°C por 24 horas. La prueba será positiva en caso de existir cambio de color de rojo a amarillo, en el fondo o en el pico de flauta. (MACFADDIN. 2000, p. 223)

### ***1.12.13 Prueba de movilidad***

Esta prueba se realiza sobre bacterias Gram negativas, para determinar si las bacterias estudiadas son móviles o inmóviles. Para la realización de esta prueba se utiliza el medio de cultivo semisólido SIM. (MACFADDIN. 2000, p. 306)

Las bacterias que son móviles presentan flagelos y pueden desplazarse a través de medio, siendo observables macroscópicamente. Las bacterias se inoculan con ayuda de una aguja por picadura en un tubo recto, se incuban a 37°C durante 24 horas. La prueba será positiva si se observa que el microorganismo migra desde la línea de siembra y se difunde en el medio, produciendo turbidez o si se observa estrías de crecimiento vellosas. (MACFADDIN. 2000, p. 306)

### ***1.12.14 Prueba de indol de Kovacs***

Esta prueba se realiza sobre bacterias Gram negativas, para determinar si tienen la capacidad de degradar el triptófano dando como resultado indol. Para la realización de esta prueba se puede utilizar diferentes medios de cultivo, entre los cuales está el medio de cultivo semisólido SIM. (MACFADDIN. 2000, p. 206)

Existen ciertas bacterias que poseen enzimas intracelulares que se denominan “triptofanasa”, que pueden oxidar el triptófano dando como resultado tres metabolitos indólicos principales, entre los cuales está el indol, que puede ser detectado con ayuda del reactivo de Kovacs, que cambia de color al entrar en contacto con el indol. (MACFADDIN. 2000, p. 206)

El reactivo de Kovacs no es un colorante ni una tinción, pero al combinarse el indol con el reactivo, tiene como resultado la formación de un compuesto quinónico de color rojo-violeta que demuestra que la prueba es positiva. (MACFADDIN. 2000, p. 207)

La prueba se realiza agregando de 3 a 5 gotas del reactivo de Kovacs agitando suavemente, directamente sobre un tubo incubado previamente durante 24 horas. La prueba será positiva si se observa la aparición de un anillo de color rojo-violeta. (MACFADDIN. 2000, p. 207)

### ***1.12.15 Prueba de ureasa***

Esta prueba se realiza sobre bacterias Gram negativas, para determinar si tienen la capacidad de hidrolizar la urea, produciendo amoníaco y CO<sub>2</sub>, por la actividad de la enzima ureasa. Para la realización de esta prueba se utiliza el medio de cultivo diferencial urea. (MACFADDIN. 2000, p. 397)

El agar urea posee el indicador de pH rojo fenol, que detecta la alcalinización del medio y cambia de color amarillo-naranja a rosado, en caso de que la prueba sea positiva. Existen bacterias que poseen la enzima ureasa considerada constitutiva que cataliza la hidrólisis de las amidas con producción de amoníaco, alcalinizando el medio. (MACFADDIN. 2000, p. 397)

La prueba se realiza en un tubo con pico de flauta, donde se inoculan las bacterias con ayuda de una aguja, estriando solo en el pico de flauta, se incuba a 37°C por 24-48 horas. La prueba será positiva en caso de existir cambio de color de amarillo-naranja a rosado. (MACFADDIN. 2000, p. 397)

#### ***1.12.16 Prueba de citrato***

Esta prueba se realiza sobre bacterias Gram negativas, para determinar si tienen la capacidad de utilizar el citrato como única fuente de carbono produciendo alcalinidad y sales amónicas inorgánicas como única fuente de nitrógeno. Para la realización de esta prueba se utiliza en medio de citrato de Simmons. (MACFADDIN. 2000, p. 92)

El medio de citrato de Simmons contiene azul de bromotimol que es un indicador ácido-base y detecta la producción de bases por acción de las bacterias. Los microorganismos que utilizan citrato como única fuente de carbono, generalmente utilizan sales de amonio como única fuente de nitrógeno, la alcalinidad del medio aumenta debido a que las bacterias extraen el nitrógeno de las sales de amonio produciendo amoníaco. (MACFADDIN. 2000, p. 92)

La prueba se realiza en un tubo inclinado o pico de flauta, donde se inoculan las bacterias con ayuda de una aguja, estriando solo en el pico de flauta, se incuba a 37°C por 24-48 horas. La prueba será positiva en caso de existir crecimiento con cambio de color de verde a azul. (MACFADDIN. 2000, p. 92)

### **1.13 Sistema de identificación de bacterias Microgen™ GnA+B-ID System**

Este es un sistema de identificación de bacterias Gram negativas y microorganismos pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, oxidasa positiva o negativa, que se vale de sustratos bioquímicos estandarizados en pocillos, los cuales cambian de color en caso de que la prueba sea positiva. (BIOPRODUCTS, 2013)

El sistema Microgen TM GnA+B-ID posee dos tiras indicadoras de micropocillos separadas, que son la tira GN A y la tira GN B, cada una de estas tiras tiene doce substratos bioquímicos estandarizados deshidratados para identificación de bacterias Gram negativas y la familia *Enterobacteriaceae*. Si alguno de los substratos es metabolizado se observa un cambio de color, y los resultados se pueden interpretar usando el Software Microgen Identification (MID-60) para identificar el microorganismo. (BIOPRODUCTS, 2013)

Las tiras indicadoras GN A, se usan en la identificación de los géneros comunes de la familia Enterobacteriaceae, oxidasa negativos, fermentadores de la glucosa y nitrato positivos. Las tiras indicadoras GN B, son utilizadas junto con las tiras GN A, no se utilizan individualmente. Las tiras GN A y GN B, son utilizadas para la identificación de bacilos Gram negativos y todas las especies de la familia *Enterobacteriaceae*. (BIOPRODUCTS, 2013)

#### **1.14 Antibiograma**

El antibiograma es un estudio en el que se mide la sensibilidad de microorganismos seleccionados a los antimicrobianos. Para realizar este estudio es necesario preparar la muestra y aislarla en los diferentes medios de cultivo indicados para cada cepa, en ningún caso se debe realizar el antibiograma directamente sobre la muestra, ya que esta generalmente suele encontrarse como una mezcla de microorganismos.

El crecimiento de los microorganismos que son sensibles a un antibiótico, es inhibido por la mínima cantidad de antimicrobiano. La CMI, es la mínima cantidad de antimicrobiano capaz de inhibir el crecimiento de un microorganismo. Se considera que los microorganismos son resistentes, cuando no son afectados por una determinada concentración de antibiótico.

## CAPÍTULO II

### 2 MARCO METODOLÓGICO

#### 2.1 Lugar y factores de Investigación

Muestreo: El muestreo se realizó en la vertiente y piscina de las aguas termales del Balneario Ecológico “Santa Ana”, ubicado en el cantón Baños de Agua Santa, provincia de Tungurahua.



(a) Puto de emergencia, vertiente

(b) Piscina

**Figura 1-2:** Balneario “Santa Ana”

Fuente: MACAS, P. 2015

Siembra de microorganismos: Se desarrolló en el Laboratorio de Análisis bioquímicos y Bacteriológicos de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Aislamiento de microorganismos: Se efectuó en el Laboratorio de Análisis bioquímicos y Bacteriológicos de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Identificación de bacterias aisladas: Se realizó en el Laboratorio de Análisis bioquímicos y Bacteriológicos de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

## 2.2 Materia prima

La materia prima son las aguas termales del Balneario Ecológico “Santa Ana”, colectadas a una altura de 1904 msnm, en la siguiente ubicación: 788477 Este (UTM) y 9845442 Norte (UTM), en la provincia de Tungurahua, cantón Baños de Agua Santa, como muestra para posterior investigación de microorganismos presentes en las mismas.

## 2.3 Materiales, equipos y medios de cultivo

### 2.3.1 *Materiales*

**Tabla 1-2:** Materiales usados

<b>Materiales</b>	
Mandil	Térmohigrómetro
Asa de platino	Pipetas automáticas
Matraz	Tubos de ensayo
Cajas petri	Puntas amarillas para pipetas
Cofia Guantes desechables	Puntas azules para pipetas
Mascarilla	Probeta
Marcador indeleble	Espátula
Envases de plástico estériles de mL	Reverbero
Cooler	Lámpara de alcohol
Bolos de hielo específico para bacterias	Guantes desechables
Palillos de dientes	Matraz Erlenmeyer
Hisopos de algodón	OXOID Discos de sensibilidad
Placas porta objetos	Piza quirúrgica
Algodón	Cámara fotográfica

Fuente: MACAS, P. 2015



### 2.3.2 Equipos y reactivos

**Tabla 2-2:** Equipos

<b>Equipos</b>	<b>Reactivos</b>
Multiparametro HANNA	Aguas destilada
Cámara de flujo laminar	Kit para tinción gram
Estufa bacteriológica	Suero fisiológico
Microscopio	Solución de yodo acuoso de <u>Lugol</u>
Autoclave	Cloruro mercuríco
Baño maría	Kovacs

Fuente: MACAS, P. 2015

### 2.3.3 Medios de cultivo

**Tabla 3-2:** Medios de Cultivo usados

<b>Medios de cultivo</b>
Placas 3M Petrifilm Aerobios totales
Placas 3M Petrifilm E. Coli/Coliformes
Placas 3M Petrifilm Mohos y Levaduras
Placas 3M Petrifilm Staph Express
Microgen TM GnA+B-IDSystem
Mueller Hinton Agar (MERCK)
Agar Mc Conkey (DifcoTM)
Agar eosina azul de metileno (acumedía)
Agar Kligler (MERCK)
Agar SIM (BBLTM)
Agar citrato (MERCK)
Agar urea (MERCK)
Agar manitol salado (BBLTM)
Agar gelatina
Agar almidón
Agar Hugh – Leifson O-F

Fuente: MACAS, P. 2015

## **2.4 Métodos y técnicas**

### **2.4.1 Muestreo**

El muestro se realizó mediante la metodología descrita en la NORMA TÉCNICA ECUATORIANA NTE INEN 1105:1983 para aguas, en el Balneario Ecológico “Santa Ana”, ubicado en la provincia de Tungurahua, cantón Baños de Agua Santa. El muestreo se realizó el 2015/02/09 a las 10H30 y se tomaron dos muestras, una del agua de la vertiente y otra de la piscina, que posteriormente fueron analizadas por duplicado.

Se tomó una muestra de la vertiente y de la piscina procurando que ésta fuese representativa y que no se contaminara. Para tomar la muestra de agua se lavaron las manos y antebrazos con agua y jabón, posteriormente se colocó las prendas de protección como: mascarilla, guantes y cofia. Se sujetó el frasco cerca de su base, se retiró el tapón con mucho cuidado y se tomó la muestra con la boca del frasco a contra corriente sin enjuagar, volviendo a taparlo inmediatamente. Posteriormente se selló el frasco en una funda estéril y se colocó en un cooler con bolos de hielo específico para bacterias.

Las muestras fueron tomadas en frascos de orina estériles, el volumen de cada muestra fue de 80mL, suficiente para realizar todos los análisis microbiológicos por duplicado. Al hacer la toma de la muestra se codificó cada frasco con el lugar, fecha y punto de muestreo, También se dejó un espacio aéreo para poder homogeneizar la muestra antes de realizar los análisis.

### **2.4.2 Análisis Físico-Químicos**

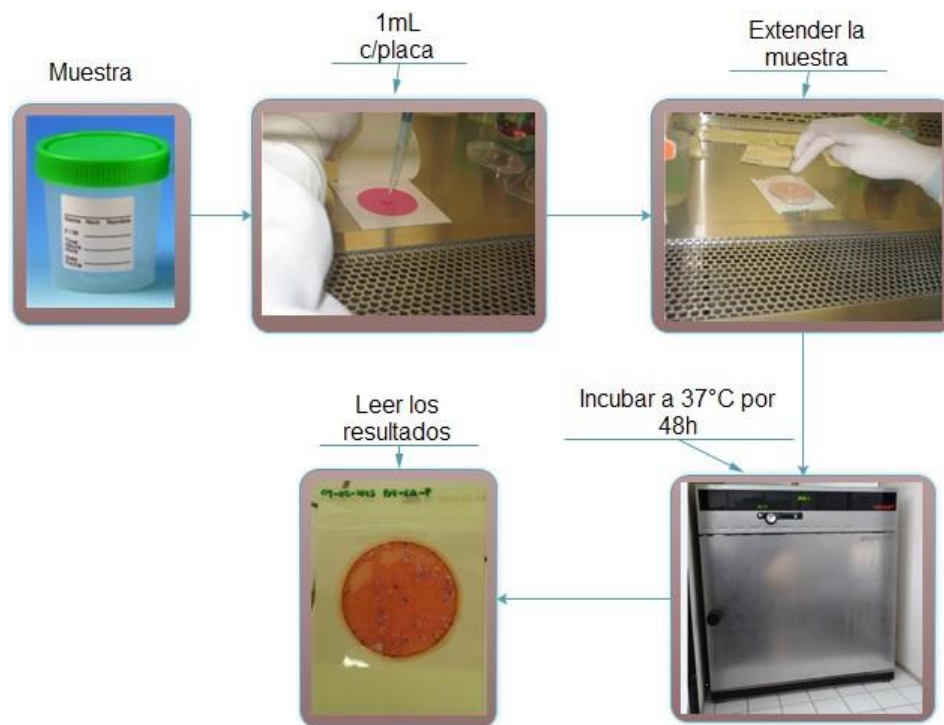
Esta prueba se realizó in situ, con ayuda del instrumento multiparámetro HANNA, en donde se tomó una muestra de agua en un recipiente de boca ancha, y previamente encendido el multiparámetro se procedió a sumergir la sonda en la muestra, seguidamente se tomó los datos de pH, temperatura, conductividad y sólidos totales disueltos que aparecen en la pantalla.

### **2.4.3 Siembra de microorganismos**

La siembra de microorganismos se realizó por medio del método de siembra en superficie, utilizando el medio de cultivo de las placas petrifilm, específico para cada tipo de microorganismos, como son: aerobios mesófilos, coliformes fecales y totales, *Staphylococcus*, mohos y levaduras.

La siembra se realizó dentro de una cámara de flujo laminar previamente esterilizada, en donde se colocó las placas Petrifilm en una superficie plana, se levantó el film superior y con ayuda de una pipeta perpendicular a la placa Petrifilm, se colocó 1mL de muestra en el centro del film inferior, se bajó el film superior.

Luego de bajar el film se colocó el aplicador sobre el inóculo evitando introducir burbujas de aire, con cuidado se ejerció presión sobre el aplicador para repartir el inóculo sobre el área circular. Posteriormente se levantó el aplicador y se esperó un minuto a que solidifique el gel, se incubaron las placas con la temperatura específica para cada tipo de microorganismos.



**Figura 2-2:** Siembra en Placas 3M™ Petrifilm™

Fuente: ANDUEZA, F. 2014

Realizado por: MACAS, P. 2015

#### 2.4.4 Determinación del número de bacterias

La determinación del número de bacterias se realizó por medio del método de conteo en placas 3M Petrifilm, específico para cada uno de los microorganismos, como son: aerobios mesófilos, coliformes fecales y totales, *Staphylococcus*, mohos y levaduras.

El conteo del número de bacterias en las placas 3M Petrifilm, se realizó por simple cuenta celular o de colonias y se expresó los resultados como unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL).

#### **2.4.5 Caracterización macroscópica de las colonias**

La caracterización macroscópica se realizó a simple vista, observando las características generales de las colonias a través de la inspección de la superficie de la placa de agar, proceso que se realizó cuidadosamente porque generalmente las bacterias se encuentran en cultivo mixto, y puede haber presentes diversos tipos de colonias.

Se efectuó sobre una superficie blanca y pareja con suficiente luz, donde se observó características morfológicas como: tamaño, textura, forma, color, elevación, superficie, la existencia de fermentación y otras características específicas de los microorganismos.

#### **2.4.6 Preparación de medios de cultivo y reactivos**

##### **2.4.6.1 Preparación de Agar Mueller-Hinton, Eosina Azul de Metileno, Manitol Salado y MacConkey**

La Preparación se realizó disolviendo cierta cantidad del medio de cultivo respectivo en agua destilada, se dejó embeber de 10 a 15 minutos, seguidamente se calentó en un reverbero con agitación constante, se lo dejó hervir durante 1 minuto para una disolución total. Posteriormente se esterilizó el medio en una autoclave a 118-121°C por 15 minutos. Luego de que la esterilización terminó se dejó enfriar el medio a 45 -50°C y se distribuyó en placas de Petri estériles, finalmente se dejó las placas de Petri en reposo para que solidifiquen.

##### **2.4.6.2 Preparación de Agar Kligler, SIM, urea y citrato de Simmons**

La Preparación se realizó disolviendo cierta cantidad del medio de cultivo respectivo en agua destilada, se dejó embeber de 10 a 15 minutos, seguidamente se calentó en un reverbero con agitación constante, se lo dejó hervir durante 1 minuto para una disolución total. Posteriormente se esterilizó el medio en una autoclave a 118-121°C por 15 minutos. Luego de que la esterilización terminó se dejó enfriar el medio a 45 -50°C y se distribuyó en tubos estériles, dejando enfriar el medio con los tubos inclinados o con pico de flauta, a excepción del medio SIM, que se dejó enfriar en posición vertical.

#### 2.4.6.3 Agar almidón

Se preparó disolviendo en agua destilada todos los componentes por calentamiento leve, ya disuelta la mezcla, se ajustó el pH a 7,5. Posteriormente se esterilizó el medio en autoclave a 118- 121°C por 15 minutos. Luego de que la esterilización terminó, se dejó enfriar el medio a 45-50°C y se distribuyó en placas de Petri.

**Tabla 4-2:** Composición del Agar almidón

<b>Composición</b>	
<b>Componente</b>	<b>Cantidades</b>
Extracto de	3,0 g
Almidón	10,0 g
Agar	12,0 g
Agua destilada	1000,0mL

Fuente: MACAS, P. 2015

#### 2.4.6.4 Agar gelatina

Se preparó disolviendo en agua destilada todos los componentes por calentamiento leve, ya disuelta la mezcla, se ajustó el pH a 7,2. Posteriormente se esterilizó el medio en autoclave a 118- 121°C por 15 minutos. Luego de que la esterilización terminó, se dejó enfriar el medio a 45-50°C y se distribuyó en placas de Petri.

**Tabla 5-2:** Composición del Agar gelatina

<b>Composición</b>	
<b>Componente</b>	<b>Cantidades</b>
Extracto de	3,0 g
Gelatina	30,0 g
Agar	12,0 g
Agua destilada	1000,0mL

Fuente: MACAS, P. 2015

#### 2.4.6.5 Reactivo de cloruro mercúrico

Se preparó disolviendo el cloruro mercúrico en el agua destilada, posteriormente se añadió el ácido lentamente y agitando constantemente.

#### 2.4.6.6 Agar Hugh - Leifson

Se disolvió en agua destilada todos los componentes, exceptuando el agar, ya disuelta la mezcla, se ajustó el pH a 7,1. Luego de esto se añadió azul de bromotimol al 0,2% y el agar, calentando hasta ebullición para una completa disolución, ya disuelto se distribuyó en cantidades de 100mL. Posteriormente se esterilizó el medio en autoclave a 118- 121°C por 15 minutos.

Luego de que la esterilización terminó, se dejó enfriar el medio a 45-50°C y se añadió asepticamente a los 100mL de medio, 10mL de una solución de glucosa al 10%, esterilizada por filtración y se mezcló profundamente. Finalmente se distribuyó en tubos a razón de 5mL y se dejó enfriar el medio con los tubos en posición vertical.

**Tabla 6-2:** Composición del Agar Hugh - Leifson

<b>Composición</b>	
<b>Componente</b>	<b>Cantidades</b>
Triptona	2,0 g
Cloruro sódico	5,0 g
Fosfato dipotásico	0,3 g
Agar	3,0 g
Agua destilada	1000,0mL

Fuente: MACAS, P. 2015

#### 2.4.7 Realización de repiques

El repique es un método de siembra, en el cual se pasa un microorganismo de un cultivo a otro medio estéril para observar la formación de pigmentos, conocer su metabolismo, conservarlo o para mantener la colonia fresca para un próximo análisis.

Los repiques se realizaron en un ambiente estéril, en donde se tomó una muestra de la colonia de las placas Petrifilm con un palillo estéril y se inoculó en el nuevo medio, se repitió este procedimiento para todas las muestras seleccionadas.

#### 2.4.8 Aislamiento bacteriano

El aislamiento se realizó por el método de siembra por estría en placa. Este método sirvió para individualizar a las bacterias que se encontraban en una mezcla y de esta manera obtener un cultivo puro.

El aislamiento se realizó tomando una pequeña porción de una de las colonias del último repique con un asa de platino, y se repartió la muestra haciendo estrías sobre la superficie de un nuevo medio de cultivo (agar Mueller Hinton) previamente preparado. El procedimiento se repitió con cada una de las bacterias seleccionadas.

#### ***2.4.9 Determinación de bacterias Gram positivas y Gram negativas***

La determinación de bacterias Gram positivas y Gram negativas se realizó por el método de tinción Gram, el cual nos da una idea clara de la morfología de las bacterias estudiadas y las divide en Gram positivas y Gram negativas.

Con los cultivos obtenidos por el método de siembra por estría en placa, se procedió a verificar la pureza de los mismos con ayuda del método de tinción Gram, de la siguiente manera: Se tomó una pequeña muestra de la colonia y se diluyó en solución salina, se colocó en el porta objetos y se fijó la muestra, posteriormente se añadió cristal violeta, se esperó 2 minutos y se enjuagó; luego se adicionó lugol, se esperó 1 minuto y se enjugó; seguidamente se colocó cetona, se esperó 30 segundos y se enjuagó; se añadió safranina, se esperó 1 minuto y se enjuagó, finalmente se seca la muestra y se observa al microscopio.

#### ***2.4.10 Prueba de catalasa***

La prueba de catalasa se realizó por medio del método descrito por MacFadin en el libro titulado Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica, para probar la existencia de la enzima en las colonias bacterianas. La prueba se realizó tomando una porción de una colonia de un cultivo puro, se colocó la muestra en un porta objetos limpio, se añadió unas gotas de peróxido de hidrógeno y se observó la producción o no de burbujeo.

#### ***2.4.11 Pruebas de oxidasa***

La prueba de oxidasa se realizó por el método descrito por MacFadin en el libro titulado Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica. La prueba se realizó utilizando un papel indicador que contiene para-amino-N-dimetil-anilina, reactivo que es oxidado por la citocromo oxidasa. Se procedió a impregnar el papel con una porción de una colonia pura, se esperó alrededor de un minuto y si la tira cambia de color a un azul-violeta la prueba se considera positiva.

#### **2.4.12 Hidrólisis del almidón**

La prueba de hidrólisis del almidón se realizó por el método descrito por MacFadin en el libro titulado Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica. Esta prueba se realizó en agar en placa, donde se inocularon las bacterias con ayuda de un asa de platino, estriando sobre la superficie del agar, se incubó a 37°C por 8 días. Cuando las bacterias ya tuvieron un crecimiento óptimo se añadió 3 gotas de solución de yodo acuoso de Lugol. Se observó en caso de existir la formación de una zona clara alrededor de la colonia para el resultado positivo.

#### **2.4.13 Hidrólisis de la gelatina**

La prueba de hidrólisis de la gelatina se realizó por el método descrito por MacFadin en el libro titulado Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica. La prueba se realizó en agar en placa, donde se inocularon las bacterias procedentes de un cultivo puro, con ayuda de un asa de platino, estriando sobre la superficie del agar, se incubó a 37°C por 8 días. Cuando las bacterias ya tuvieron un crecimiento óptimo se cubrió la superficie del agar con algunas gotas del reactivo de cloruro mercurico. Se observó la formación de una zona clara alrededor de la colonia, en caso de que la prueba resulte positiva.

#### **2.4.14 Prueba de oxidación-fermentación**

Se disuelve todos los componentes en el agua, a excepción del agar y se ajusta a pH 7,1. Se añade 15 ml de azul de bromotimol al 0,2% y el agar, calentando hasta ebullición para que se disuelva por completo. Se Distribuye en cantidades de 100 ml y se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Se atempera a 45-50°C y se añade asépticamente a 100 ml de medio estéril, 10 ml de una solución de glucosa al 10% esterilizada por filtración, mezclando a fondo. Se dispensa asépticamente cantidades de 5 ml en tubos estrechos estériles de 8x160 mm. Se mantiene los tubos en posición vertical. (MACFADDIN, J. 2000, p. 400)

#### **2.4.15 Preparación de Agar Hierro de Kligler**

Se suspende 52 g del polvo en 1 L de agua destilada. Se mezcla bien. Se calienta agitándolo frecuentemente y hervir durante 1 minuto para disolver completamente el polvo. Ajustar pH a 7,4 ± 0,2. Se autoclava a 121°C durante 15 minutos. Se enfría el medio en el tubo en posición parcialmente inclinado.



#### **2.4.16 Prueba de movilidad**

Esta prueba se realiza sobre bacterias Gram negativas, para determinar si las bacterias estudiadas son móviles o inmóviles. Para la realización de esta prueba se utiliza el medio de cultivo semisólido SIM. (MACFADDIN, 2003, p. 104)

Las bacterias que son móviles presentan flagelos y pueden desplazarse a través de medio, siendo observables macroscópicamente. Las bacterias se inoculan con ayuda de una aguja por pica- dura en un tubo recto, se incuban a 37°C durante 24 horas. La prueba será positiva si se observa que el microorganismo migra desde la línea de siembra y se difunde en el medio, produciendo turbidez o si se observa estrías de crecimiento veloso. (MACFADDIN, 2003, p. 104)

#### **2.4.17 Prueba de Kovacs**

Esta prueba se realiza sobre bacterias Gram negativas, para determinar si tienen la capacidad de degradar el triptófano dando como resultado indol. Para la realización de esta prueba se puede utilizar diferentes medios de cultivo, entre los cuales está el medio de cultivo semisólido SIM. (MACFADDIN, 2003, p. 22)

Existen ciertas bacterias que poseen enzimas intracelulares que se denominan “triptofanasa”, que pueden oxidar el triptófano dando como resultado tres metabolitos indólicos principales, entre los cuales está el indol, que puede ser detectado con ayuda del reactivo de Kovacs, que cambia de color al entrar en contacto con el indol. (MACFADDIN, 2003, p. 22)

El reactivo de Kovacs no es un colorante ni una tinción, pero al combinarse el indol con el reactivo, tiene como resultado la formación de un compuesto quinónico de color rojo-violeta demuestra que la prueba es positiva. (MACFADDIN, 2003, p. 23)

La prueba se realiza agregando de 3 a 5 gotas del reactivo de Kovacs agitando suavemente, directamente sobre un tubo incubado previamente durante 24 horas. La prueba será positiva si se observa la aparición de un anillo de color rojo-violeta. (MACFADDIN, 2003, p. 23)

#### **2.4.18 Prueba de ureasa**

Esta prueba se realiza sobre bacterias Gram negativas, para determinar si tienen la capacidad de hidrolizar la urea, produciendo amoníaco y CO<sub>2</sub>, por la actividad de la enzima ureasa. Para la realización de esta prueba se utiliza el medio de cultivo diferencial urea. (MACFADDIN, 2003, p. 245)

El agar urea posee el indicador de pH rojo fenol, que detecta la alcalinización del medio y cambia de color amarillo-naranja a rosado, en caso de que la prueba sea positiva. Existen bacterias que poseen la enzima ureasa considerada constitutiva que cataliza la hidrólisis de las amidas con producción de amoníaco, alcalinizando el medio. (MACFADDIN, 2003, p. 245)

La prueba se realiza en un tubo con pico de flauta, donde se inoculan las bacterias con ayuda de una aguja, estriando solo en el pico de flauta, se incuba a 37°C por 24-48 horas. La prueba será positiva en caso de existir cambio de color de amarillo-naranja a rosado. (MACFADDIN, 2003, p. 246)

#### **2.4.19 Prueba de citrato**

La prueba de citrato se realizó por el método de inoculación. Esta prueba se efectuó en un tubo con pico de flauta, donde se inocularon las bacterias con ayuda de una aguja, estriando solo en la superficie inclinada, se incubó a 37°C por 24-48 horas. Se observó un cambio de color de verde a azul, en caso de ser positivo. (MACFADDIN, 2003, p. 256)

### **2.5 Sistema de identificación de bacterias Microgen™ GnA+B-ID System**

La prueba se realizó sobre colonias provenientes de cultivo puro, conociendo previamente los resultados de catalasa y oxidasa. Esta prueba se efectuó emulsionando una porción de la colonia en 3 mL de solución salina estéril al 0.85 %, se retiró la tira adhesiva y se añadió de 3-4 gotas de la suspensión bacteriana en cada pocillo tanto para la tira GN A y GN B. (BIOPRODUCTS, 2013, p. 2)

Se procedió a enumerar la tira GN A empezando por el final de la etiqueta, siguiendo con la tira GN B. Se añadió de 3-4 gotas de aceite mineral a los pocillos 1, 2, 3, 20 y 24 de las tiras GN A y GN B numerados previamente. Posteriormente se selló la parte superior de las tiritas con la cinta adhesiva retirada previamente, y se incubó a 37°C por 18-24 horas. (BIOPRODUCTS, 2013, p. 2)

Transcurrido el tiempo de incubación de la tira GN A, se retiró la cinta adhesiva y se procedió a anotar los resultados de las reacciones positivas y negativas. En el micropocillo 8 se añadió 2 gotas de reactivo de Kovacs, se esperó 60 segundos y se observó la formación de un anillo rojo para la prueba positiva. En el micropocillo 10 se añadió 1 gota de reactivo VP I y 1 gota del reactivo VP II, se esperó de 15-30 segundos y se observó la formación de un color rosa/rojo para la prueba positiva. (BIOPRODUCTS, 2013, p. 2)

En el micropocillo 12 se añadió 1 gota del reactivo TDA, se esperó de 60 segundos y se observó la formación de un color rojo cereza para la prueba positiva. En el micropocillo 7 después de leer los resultados se añadió 1 gota del reactivo Nitrato A y 1 gota del reactivo Nitrato B, se esperó de 60 segundos y se observó la formación de un color rojo para la prueba positiva de reducción de nitrato. (BIOPRODUCTS, 2013, p. 2)

Transcurrido el tiempo de incubación de la tira GN B, se retiró la cinta adhesiva y se procedió a anotar los resultados de las reacciones positivas y negativas. Los resultados del micropocillo 13 que corresponde al de gelatina se observaron transcurridos 18-24 horas, para Enterobacteriaceae y 48 horas para los microorganismos oxidasa positiva, y se identificó la prueba como positiva por la formación de partículas negras. En el micropocillo de la arginina después de 24-48 horas de incubación se observó la formación de color verde/azul para la prueba positiva de Enterobacteriaceae y de un color azul para los microorganismos oxidasa positiva. (BIOPRODUCTS, 2013, p. 3)

Se anotó los datos observados en una hoja de resultados de Microgen GN-ID A+B, en donde los substratos están organizados por tripletes que poseen un valor numérico cada uno, se sumó las reacciones positivas para obtener el perfil numérico. Se introdujo el perfil numérico en el Software Microgen Identification System (MID-60) y se obtuvo los resultados. (BIOPRODUCTS, 2013, p. 3)

## **2.6 Antibiograma**

La prueba de sensibilidad a los antibióticos se realizó por el método de Kirby Bauer. Esta prueba se efectuó en placas de agar Mueller Hinton, en donde se tomó una colonia de un cultivo puro, se la suspendió en suero fisiológico y se estandarizó con 0.5 unidades MarkFarland, posteriormente se sumergió un hisopo de algodón en la suspensión microbiana, se eliminó el exceso y se estrió por la superficie del agar en cinco direcciones, girando 60° cada vez y dando una vuelta al ruedo, luego se dejó secar por 10 minutos.

Una vez seco el inóculo se colocó de 6-8 discos de sensibilidad individualmente con una pinza

quirúrgica flameada, se incubó a 37°C por 24 horas. Transcurridas 24 horas de incubación, se procedió a medir los halos de inhibición con una regla. Los antibióticos usados son los siguientes:

1. Trimetoprim1/sulfametoxazol
2. Ceftriaxona
3. Amoxicilina/ácido clavulánico
4. Imipenem
5. Cefalotina
6. Gentamicina
7. Ampicilina
8. Kanamicina
9. Penicilina
10. Azitromicina
11. Vancomicina
12. Oxaciclina
13. Eritromicina
14. Novobiocina
15. Ciprofloxacina

2.7 Flujogramas de identificación de géneros y especies de las colonias aisladas de la muestra de la vertiente y piscina del Balneario “Santa Ana”

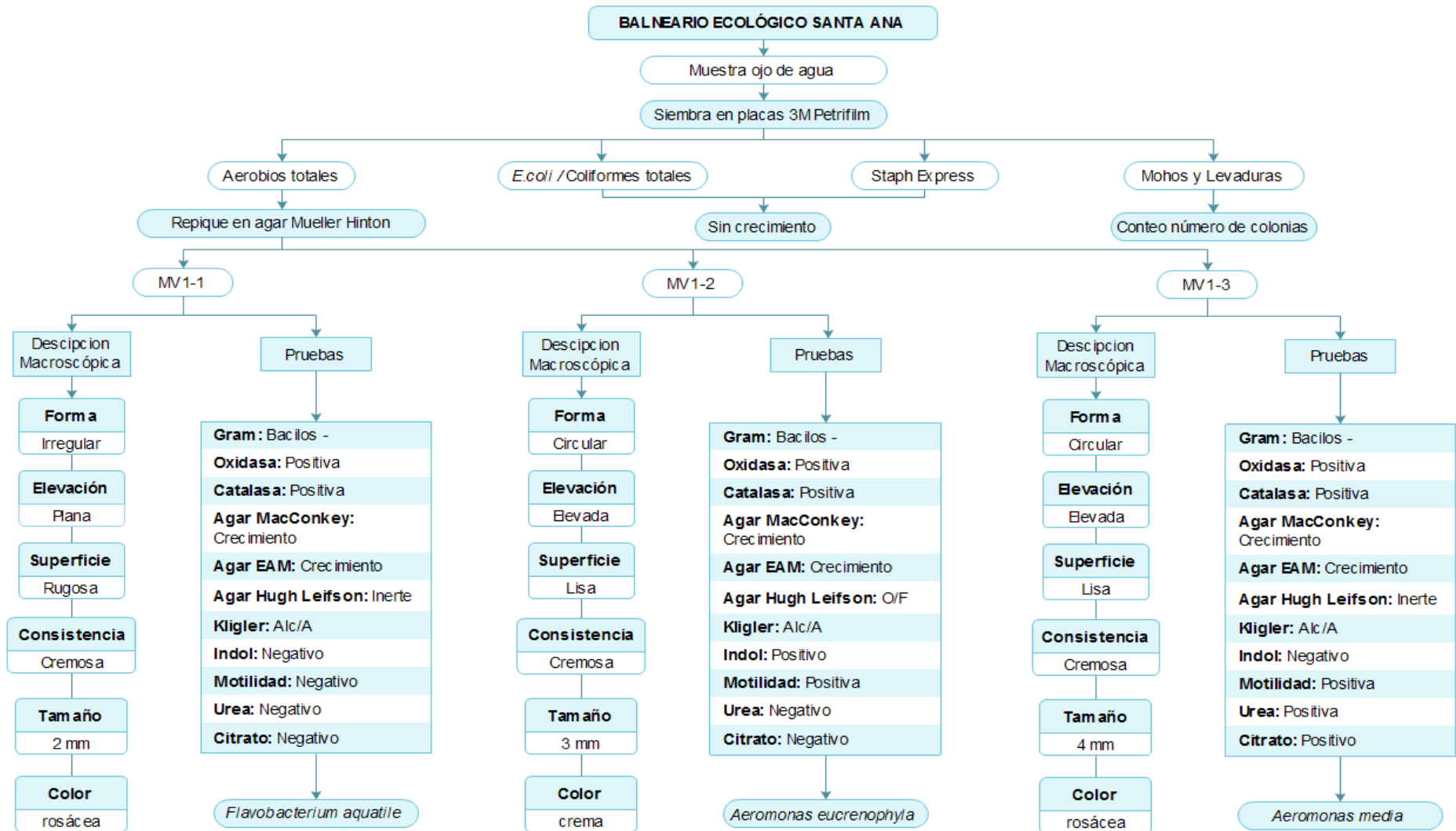
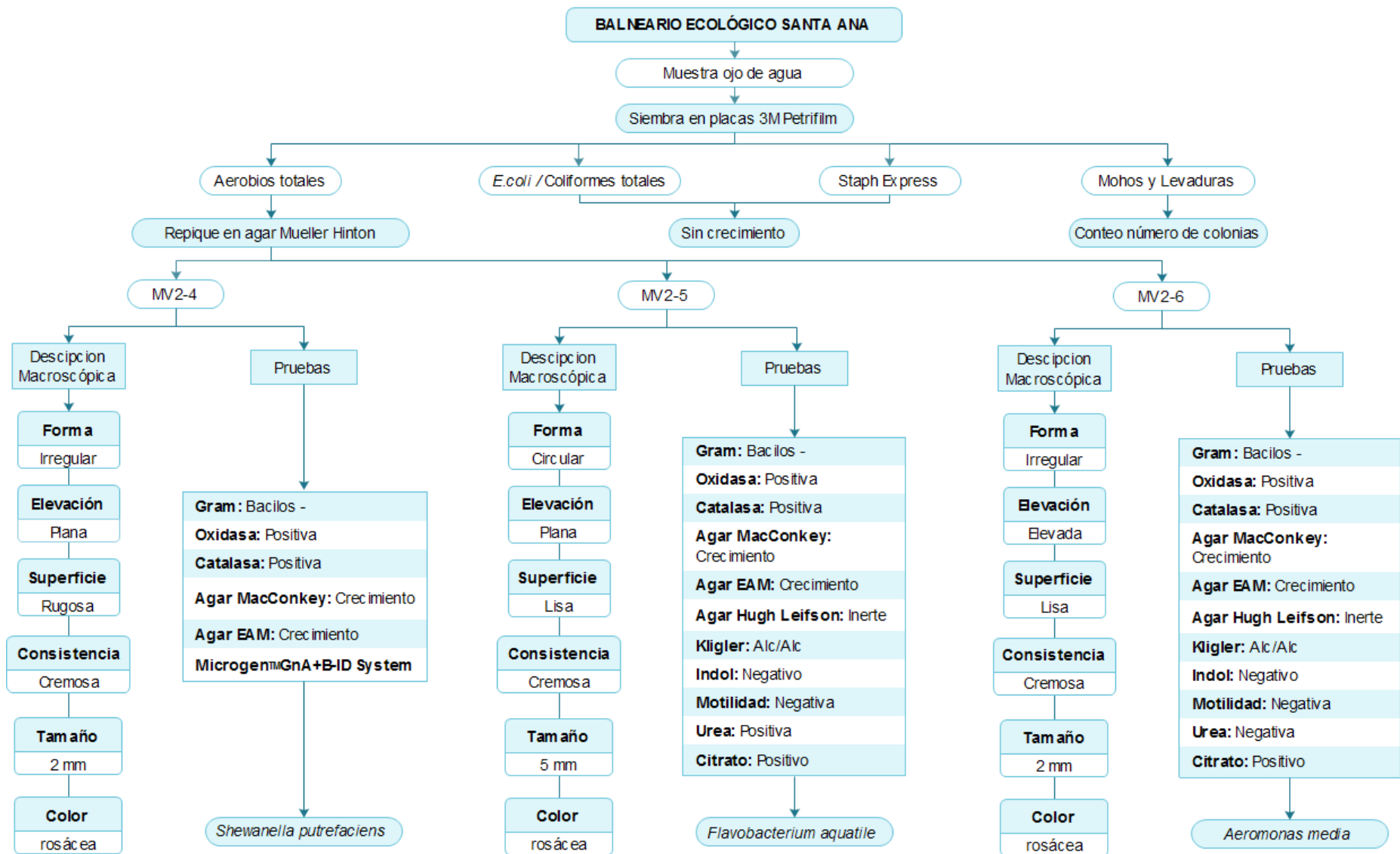
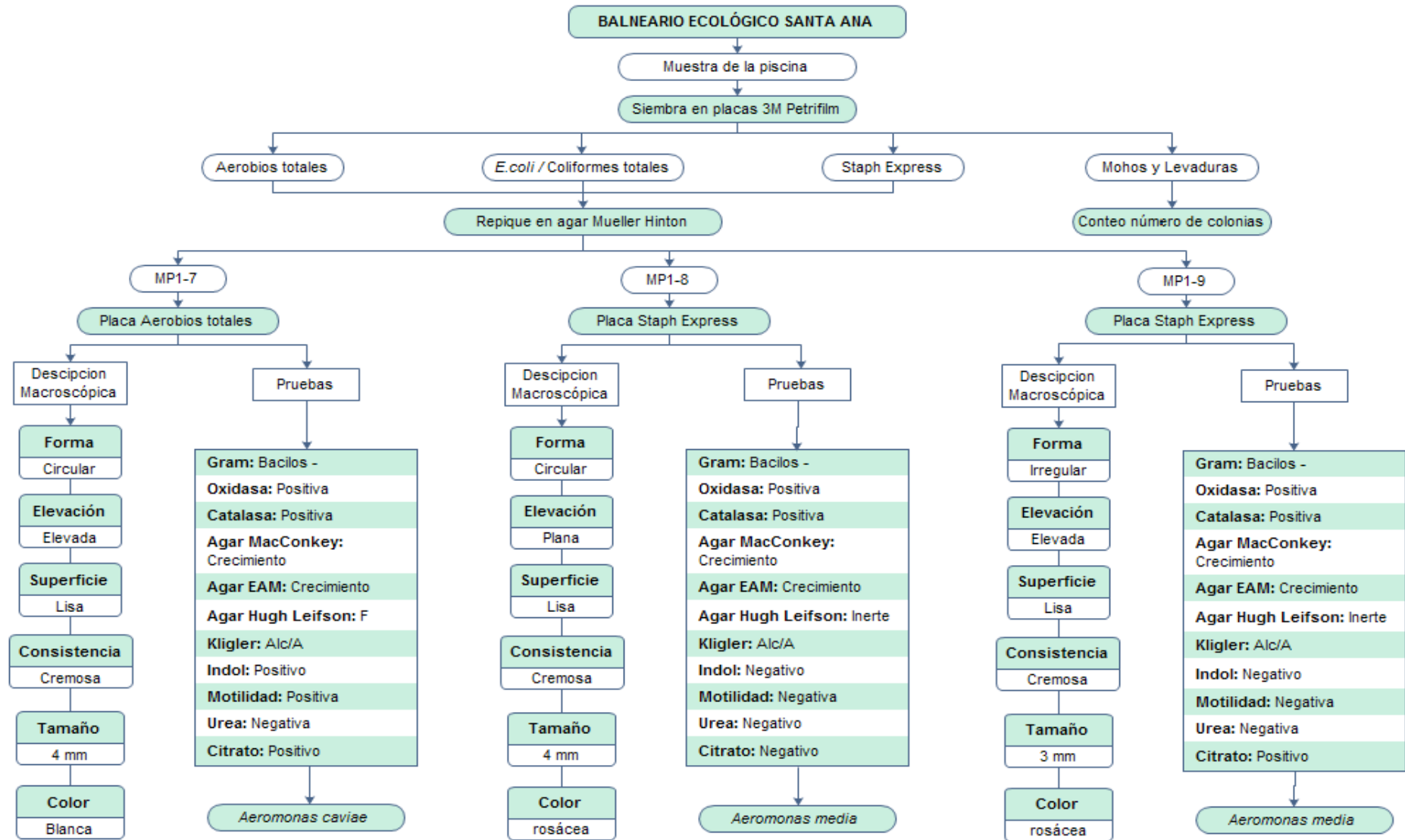


Figura 3-2: Identificación de las cepas MV1-1, MV1-2, MV1-3

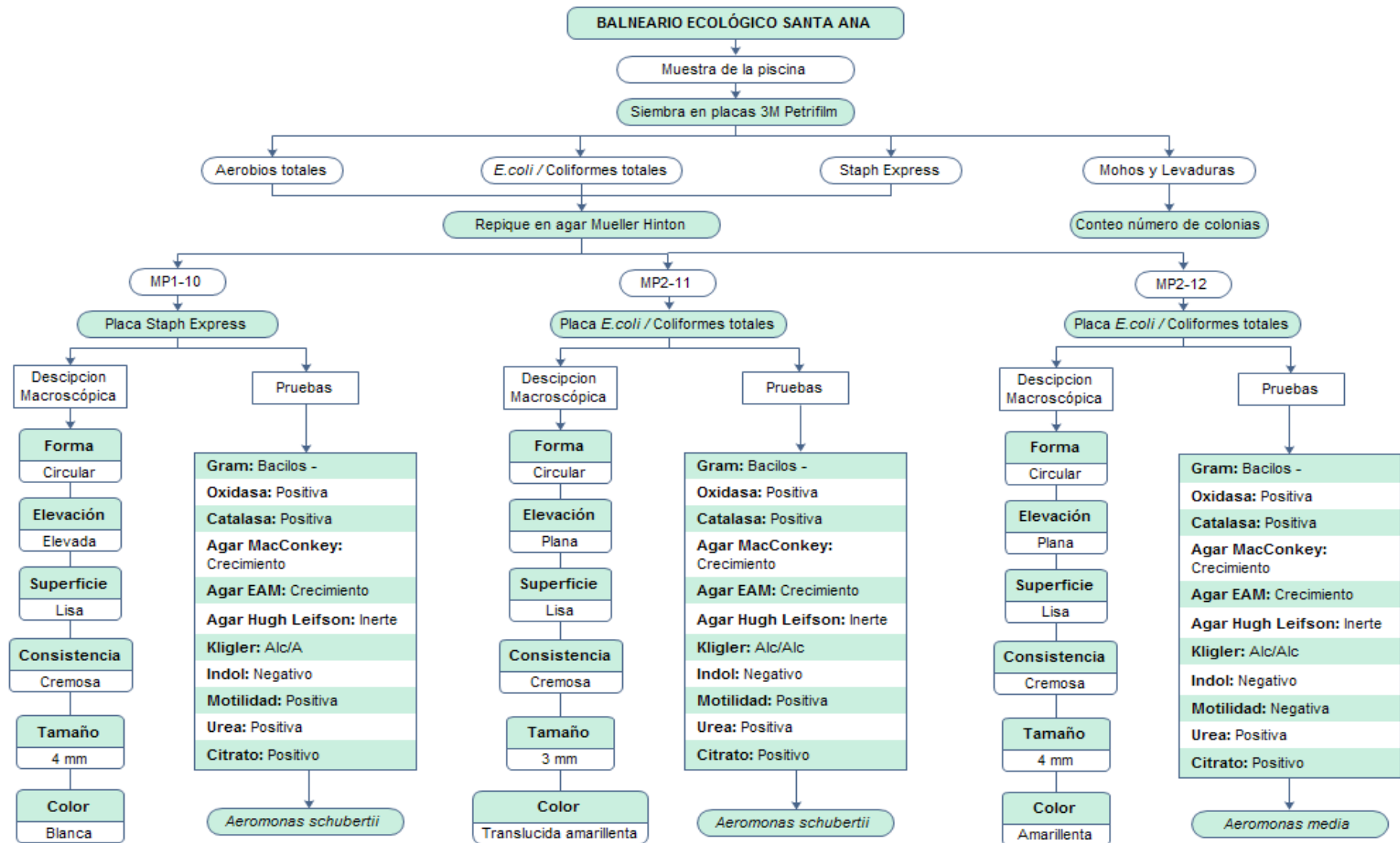
Fuente: MACAS, P, 2015



**Figura 4-2:** Identificación de las cepas MV2-4, MV2-5, MV2-6  
Fuente: MACAS, P, 2015

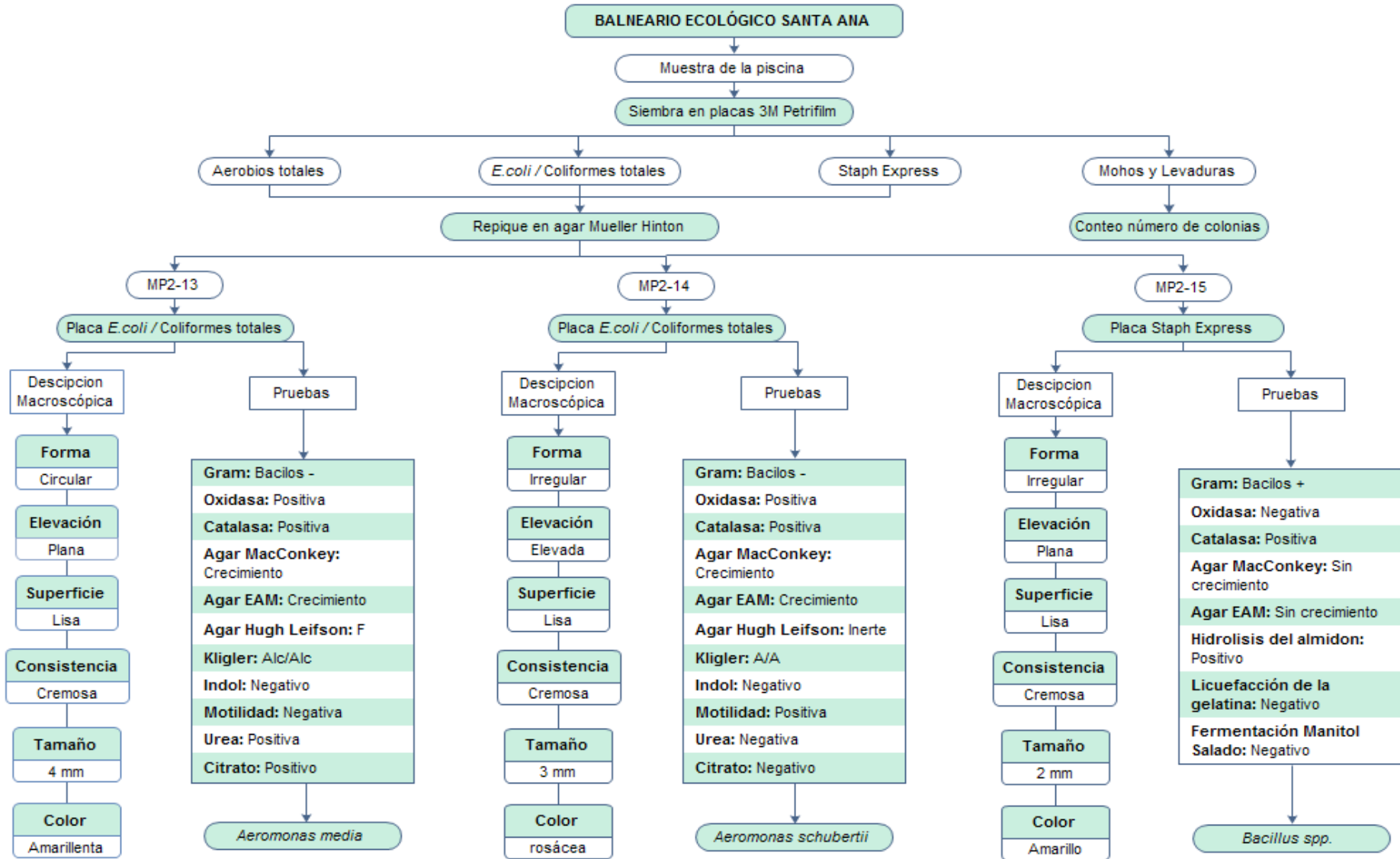


**Figura 5-2:** Identificación de las cepas MP1-7, MP1-8, MP1-9  
Fuente: MACAS, P, 2015

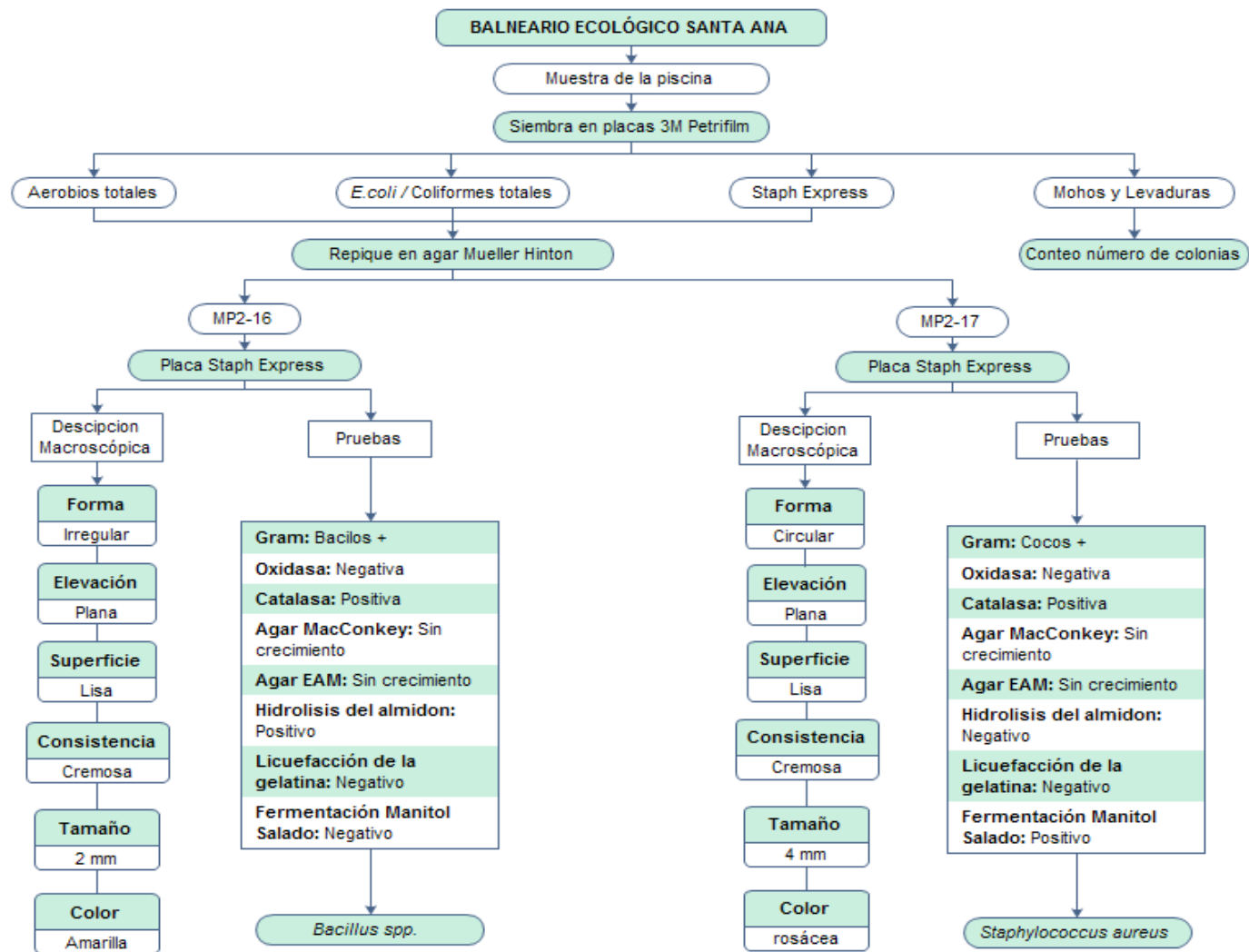


**Figura 6-2:** Identificación de las cepas MP1-10, MP2-11, MP2-12  
Fuente: MACAS, P, 2015





**Figura 7-2:** Identificación de las cepas MP2-13, MP2-14, MP2-15  
Fuente: MACAS, P, 2015



**Figura 7-2:** Identificación de las cepas MP2-16, MP2-17  
Fuente: MACAS, P. 2015

## CAPITULO III

### 3 MARCO DE RESULTADOS, DISCUSION Y ANALISIS DE RESULTADOS

#### 3.1 Parámetros físico-químicos del agua de la vertiente y piscina del Balneario Ecológico “Santa Ana”

**Tabla 1-3:** Resultados del análisis físico-químico del agua de la vertiente y piscina del Balneario “Santa Ana”.

Muestreo 1 (2015/2/9)				
Muestra	Temperatura [°C]	pH	Sólidos totales disueltos	Conductividad
MV	46,3	7,3	> 2000 ppm	> 3999 $\mu S/cm$
MP	38,3	7	> 2000 ppm	> 3999 $\mu S/cm$
Ambiente	25,4	-	-	-

Fuente: MACAS P., 2015

En la tabla 1-3 se aprecian los valores de temperatura, sólidos totales disueltos, conductividad y pH de las aguas termales del Balneario “Santa Ana”. La temperatura del agua en la vertiente fue de 46.3°C la temperatura del agua en la piscina fue de 38.3°C y la temperatura ambiente de 25.4°C, los valores de sólidos totales fueron superiores a 2000 ppm tanto para la piscina como para la vertiente, y los valores de conductividad fueron superiores a 3999  $\mu S/cm$  en el caso de la piscina y la vertiente. Los valores de pH fueron de 7.3 y 7 para la vertiente y la piscina respectivamente.

Los valores de temperatura del agua de la vertiente fueron mayores con 20.9°C a la temperatura del ambiente, es por ello que estas aguas son clasificadas como aguas hipertermales, ya que cumplen con el criterio de clasificación de aguas según su temperatura, el cual establece que se consideran aguas hipertermales cuando poseen temperaturas de más de 45°C.

Con respecto al agua de la piscina se puede observar que la temperatura es de 38.3°C, mucho menor a la temperatura de la vertiente, esta diferencia de temperatura se debe a la distancia que recorre el agua termal desde la vertiente hasta la piscina por medio de mangueras y tuberías de materiales plásticos, pero sigue cumpliendo con los criterios de termalidad, ya que el agua es de origen hipertermal.

En la clasificación de las fuentes termales del estado Trujillo en 2007, se registraron aguas hipertermales con valores de temperatura de 40 – 80°C. Los valores de temperatura registrados en este trabajo están dentro del criterio de clasificación utilizado en el manantial anteriormente mencionado y clasifica a las aguas del Balneario Ecológico "Santa Ana" como hipertermales. (MORENO et al., 2007, p. 253)

En el análisis físico-químico de fuentes de aguas termo-minerales del Callejón de Huaylas en 2006, se reportaron valores de temperatura de 66°C en la vertiente de Chancos, que clasifica a las aguas como hipertermales, similares a la clasificación de las aguas del Balneario "Santa Ana".

En el estudio realizado por el personal del Grupo de Hidrogeología del Subproceso de Estudios e Investigaciones Hidrológicas de la Dirección de Gestión de Hidrología del INAMHI, se reportaron valores de temperatura de 50°C en las aguas de la vertiente termal del Balneario Ecológico "Santa Ana". Los valores de temperatura registrados concuerdan con el criterio de hipertermalidad, al igual que los valores registrados en el presente trabajo.

La temperatura es uno de los factores más importantes en el desarrollo de microorganismos autóctonos, debido a que cada uno de ellos posee un intervalo propio de temperatura para su óptimo crecimiento y si se encuentran a menor temperatura se inhibe el crecimiento y a mayor temperatura se mueren, esto los vuelve únicos en las aguas termales estudiadas.

Los valores de pH fueron tomados con el propósito de averiguar en qué escala se desarrollan los microorganismos de las aguas termales de la vertiente y piscina del Balneario "Santa Ana". Tomando en cuenta los valores de pH registrados se pudo determinar que tanto la piscina como la vertiente poseen un pH ligeramente neutro ya que cada una tuvo valores de pH 7 y 7.3.

Los valores de pH obtenidos en el presente trabajo, concuerdan con los valores de pH registrados en el estudio realizado por el personal del Grupo de Hidrogeología del Subproceso de Estudios e Investigaciones Hidrológicas de la Dirección de Gestión de Hidrología del INAMHI, donde se reportaron valores de pH 7.2 en el agua de la vertiente del Balneario "Santa Ana".

Los resultados de pH obtenidos, son similares a los valores registrados en el análisis físico-químico de las aguas mineromedicinales del Balneario de Puente Viesgo en España en 2007, donde se encontraron valores de pH alrededor de 7 que clasifica a las aguas como ligeramente básicas. (LOPEZ et al., 2007, p. 13)

En el estudio físico-químico de las aguas mineromedicinales del Balneario de Alicún de las Torres en 2009, se reportaron valores de pH ligeramente superiores a 7, similares a los valores obtenidos en el presente trabajo. (DE LA ROSA et al., 2009, p. 47)

Con respecto a los valores de conductividad registrados en el presente trabajo, son superiores a  $3999 \mu S/cm$ , dato que concuerda con estudio realizado por el personal del Grupo de Hidrogeología del Subproceso de Estudios e Investigaciones Hidrológicas de la Dirección de Gestión de Hidrología del INAMHI, en el cual se registraron valores de  $5090 \mu S/cm$ .

En el estudio físico-químico de las aguas mineromedicinales del Balneario de Alhama de Granada en 2008, se registraron valores de conductividad de  $979 \mu S/cm$  a  $20^{\circ}C$ . En el presente estudio se registraron valores de conductividad superiores a  $3999 \mu S/cm$ , tomados a  $46.3^{\circ}C$  y  $38.3^{\circ}C$ , la diferencia de conductividad con el Balneario de Alhama de Granada se debe, a que la conductividad del agua aumenta a medida que se eleva la temperatura. (MOSSO et al., 2008, p. 46)

En el estudio físico-químico de las aguas mineromedicinales del Balneario El Raposo en 2013, se registraron valores de conductividad de  $1036.43 \mu S/cm$ , tomados a  $20^{\circ}C$ . En el presente estudio los valores de conductividad fueron tomados a  $46.3^{\circ}C$  y  $38.3^{\circ}C$ , razón por la cual son significativamente mayores que los resultados del Balneario El Raposo.

El análisis de sólidos totales disueltos dio como resultados valores superiores a  $2000 ppm$ , para la vertiente y la piscina, dato que concuerda con el estudio realizado por el personal del Grupo de Hidrogeología del Subproceso de Estudios e Investigaciones Hidrológicas de la Dirección de Gestión de Hidrología del INAMHI, en el cual se registraron valores de conductividad de  $3293.23 ppm$ .

En el estudio físico-químico de las aguas del Balneario de Alicún de las Torres en 2009, se registraron valores de residuo seco de  $1964 ppm$  a  $180^{\circ}C$ , valores que son inferiores a los registrados en esta investigación, lo que demuestra que el Balneario “Santa Ana” posee una mayor cantidad de sólidos totales disueltos en el agua. (DE LA ROSA et al., 2009, p. 47)

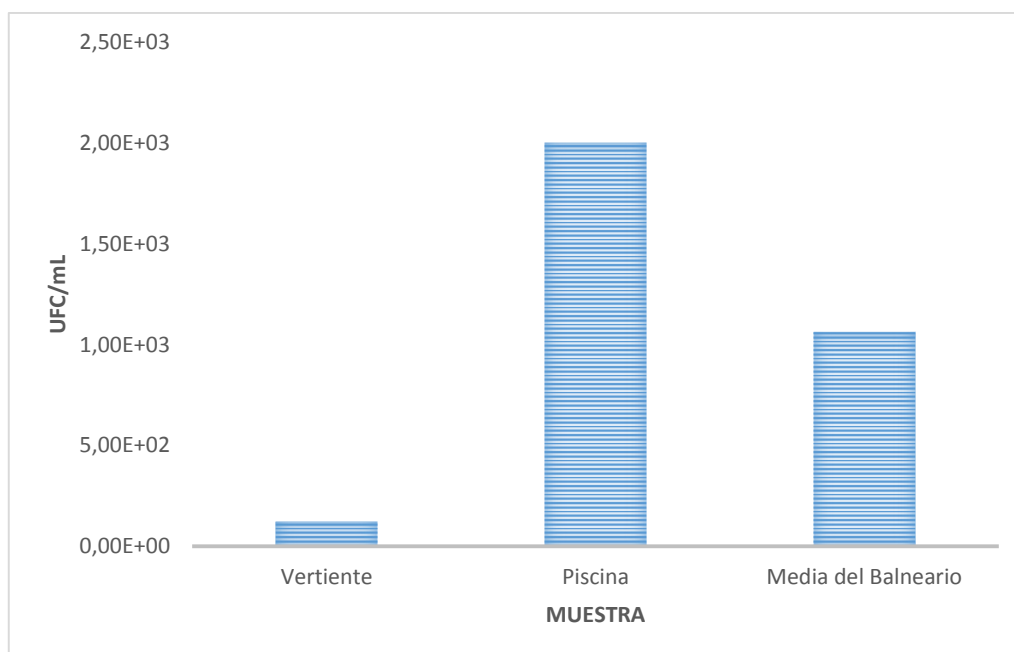
En el análisis físico-químico de fuentes de aguas termo-minerales del Callejón de Huaylas en 2006, se reportaron valores de sólidos totales disueltos de  $3508$  y  $3754 ppm$  para la fuente de Chancos y Monterrey respectivamente, similares a los valores obtenidos en este trabajo.

### 3.2 Resultado del conteo de Bacterias Aerobias Mesófilas presentes en la vertiente y piscina del Balneario Ecológico “Santa Ana”

**Tabla 2-3:** Resultado del análisis de Aerobias Mesófilas

Muestra	Análisis	UFC/mL	Media (x)
Vertiente	1	$1,30 \times 10^2$	$1,23 \times 10^2$
	2	$1,16 \times 10^2$	
Piscina	1	$2,00 \times 10^3$	$2,00 \times 10^3$
	2	$2,00 \times 10^3$	
<b>Media del Balneario</b>			$1,06 \times 10^3$
<b>Varianza</b>			$1,17 \times 10^6$
<b>Desviación estándar</b>			$1,08 \times 10^3$

Fuente: MACAS, P. 2015



**Figura 1-3:** Resultado del conteo de Aerobios Mesófilos

Fuente: MACAS, P. 2015

En la tabla 2-3, se puede apreciar la cantidad de bacterias aerobias mesófilas por número de muestra a las 48 horas de incubación, donde existe un mayor crecimiento de bacterias en la muestra correspondiente a la piscina con una media de  $2,00 \times 10^3$ , y un menor crecimiento en la muestra de la vertiente con una media de  $1,23 \times 10^3$ .

El número de bacterias aerobias mesófilas en la vertiente es ligeramente superior a 100 UFC/mL, este valor difiere con los resultados obtenidos por el estudio realizado en el Balneario de Alhama de Granada en 2002, donde el número de bacterias aerobias es bastante reducido, esto se debe a que pocas bacterias crecen a temperaturas elevadas. La diferencia en el número de bacterias encontradas, indica que no existe una protección adecuada de la vertiente termal del Balneario “Santa Ana”, debido a que se encuentra en contacto directo con el exterior.

En el estudio microbiológico de las aguas mineromedicinales de los Balnearios de Jaraba realizado en 2004, se encontró un número de bacterias heterótrofas aerobias viables menor a 10 UFC/mL, lo que demuestra un adecuado perímetro de protección, al contrario de las aguas termominerales del Balneario “Santa Ana” en las que se encontraron un número de bacterias superior a 100 UFC/mL. (BELTRÍA et al., 2004, p. 65)

En el estudio de la microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario Cervantes realizado en 2006, se reportó un número de bacterias aerobias viables inferior a 100 UFC/mL. En el presente estudio se obtuvo valores superiores al señalado anteriormente, dato que demuestra una mala protección de la vertiente termal.

En el estudio titulado Microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario de Valdelateja, se obtuvo un número de bacterias aerobias viables inferior a 100 UFC/mL, mientras que en el presente estudio se obtuvo números superiores, lo que indica una mala protección y aislamiento de la vertiente termal del Balneario “Santa Ana”. (MOSSO et al., 2008, p. 75)

En el estudio titulado Microbiología del manantial mineromedicinal del Balneario Puente Viesgo realizado en 2007, se obtuvo un número de bacterias aerobias viables menor a 10 UFC/mL. En el presente estudio se obtuvo un número de bacterias aerobias totales superior a 100 UFC/mL tanto en la vertiente como en la piscina, lo que demuestra que no hay una adecuada protección de la vertiente termal y una contaminación en la piscina. (DE LA ROSA et al., 2007, p. 35)

En el estudio microbiológico de los manantiales mineromedicinales del Balneario de Baños de la Concepción realizado en 2007, se encontró un número de bacterias aerobias viables inferior a 20 UFC/mL, siendo diferente al número de bacterias obtenidas en el presente trabajo que fue superior a 100 UFC/mL, tanto en la vertiente como en la piscina. (MOSSO et al., 2011, p. 74)

En la muestra de la piscina se encontró un mayor número de bacterias, esto se debe al uso del agua por los turistas y la misma se ve contaminada con la flora normal del cuerpo humano que es diferente en cada persona, otro factor que puede contribuir a la contaminación en la piscina es la inadecuada limpieza y desinfección.

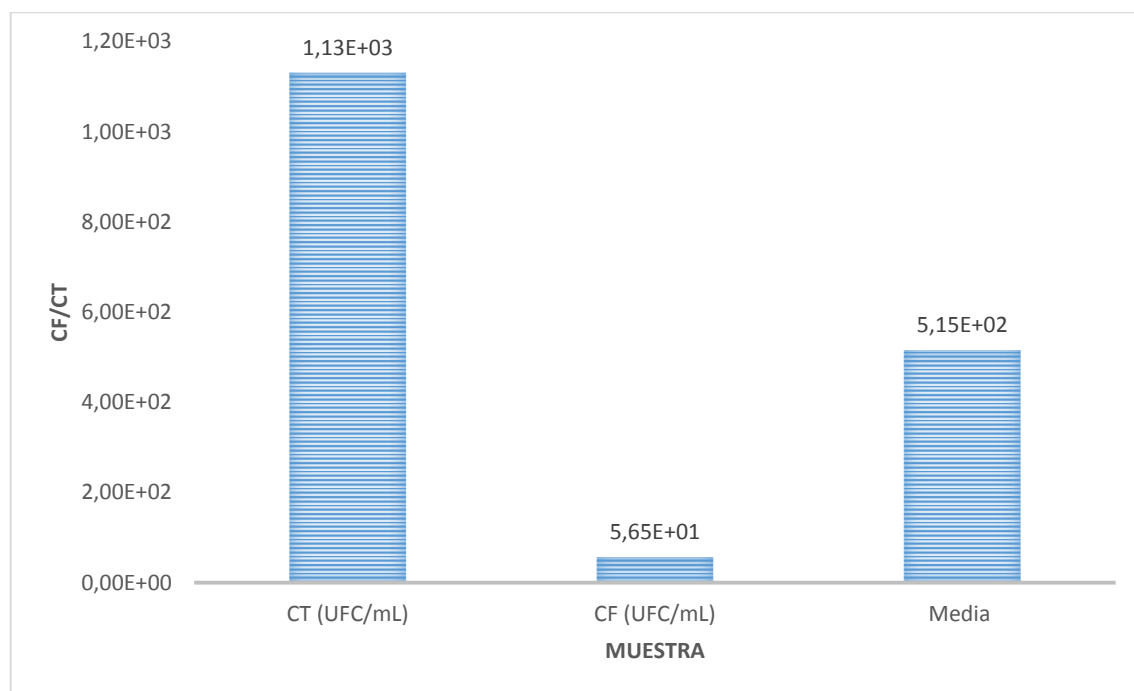
### 3.3 Resultado del conteo de bacterias Coliformes totales y Coliformes fecales presentes en la vertiente y piscina del Balneario Ecológico "Santa Ana"

**Tabla 3-3:** Resultados de análisis de coliformes fecales y totales

Muestra	Análisis	CT (UFC/mL)	CF (UFC/mL)
Vertiente	1	0	0
	2	0,00E+00	0,00E+00
Piscina	1	1,12E+03	6,10E+01
	2	1,14E+03	5,20E+01
<b>Media</b>		1,13E+03	5,65E+01
<b>Media del Balneario</b>		5,93E+02	
<b>Varianza</b>		2,65E+05	
<b>Desviación estándar</b>		5,15E+02	

Fuente: MACAS, P. 2015

**CT:** Coliformes totales



**Figura 2-3:** Recuento de *Escherichia coli* y Coliformes Totales de "Santa Ana"

Fuente: MACAS, P. 2015



En la tabla 3-3 se puede observar los resultados del conteo de bacterias coliformes totales y fecales de la muestra de la vertiente y de la piscina. En la muestra de la vertiente no hubo crecimiento bacteriano, mientras que en la muestra de la piscina se registró un mayor crecimiento de bacterias con una media de  $1,13 \times 10^3$  UFC/mL para los coliformes totales y  $5,65 \times 10$  UFC/mL para los coliformes fecales.

Los resultados obtenidos de la muestra de la vertiente concuerdan con los datos del estudio microbiológico del Balneario de Alhama de Granada realizado en 2002 (MOSSO et al., 2002, p. 75); el estudio realizado en las aguas termales del estado Trujillo en 2007 (MORENO et al., 2007, p. 86), en los que no se encontraron bacterias coliformes fecales y totales, lo que indica que las aguas del Balneario “Santa Ana” no se encuentran contaminadas con aguas residuales.

En el estudio de la microbiología de las aguas del Balneario de La Toja, no se encontraron la presencia de bacterias coliformes fecales y totales en la muestra de la vertiente, al igual que en el presente estudio, esto indica que el agua de la vertiente no está contaminada con filtraciones de aguas residuales. (DE LA ROSA et al., 1993, p. 96)

En el estudio microbiológico de las aguas mineromedicinales de los Balnearios de Jaraba realizado en 2004, no se encontraron indicadores fecales ni bacterias patógenas, concordando con los datos obtenidos en el presente estudio, ya que no hubo crecimiento de bacterias coliformes totales y fecales. (BELTRAN, et al., 2004, p. 80)

En los estudios microbiológicos realizados a las aguas los manantiales mineromedicinales del Balneario Cervantes realizado en 2009, no se encontró la presencia de indicadores fecales, dato que concuerda con el presente trabajo y demuestra que no existe contaminación del agua. Los datos obtenidos revelan que no hubo crecimiento de bacterias coliformes totales y fecales en las aguas de la vertiente del Balneario “Santa Ana”, cumpliendo con los requisitos del agua potable descritos en la Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1108:2011.

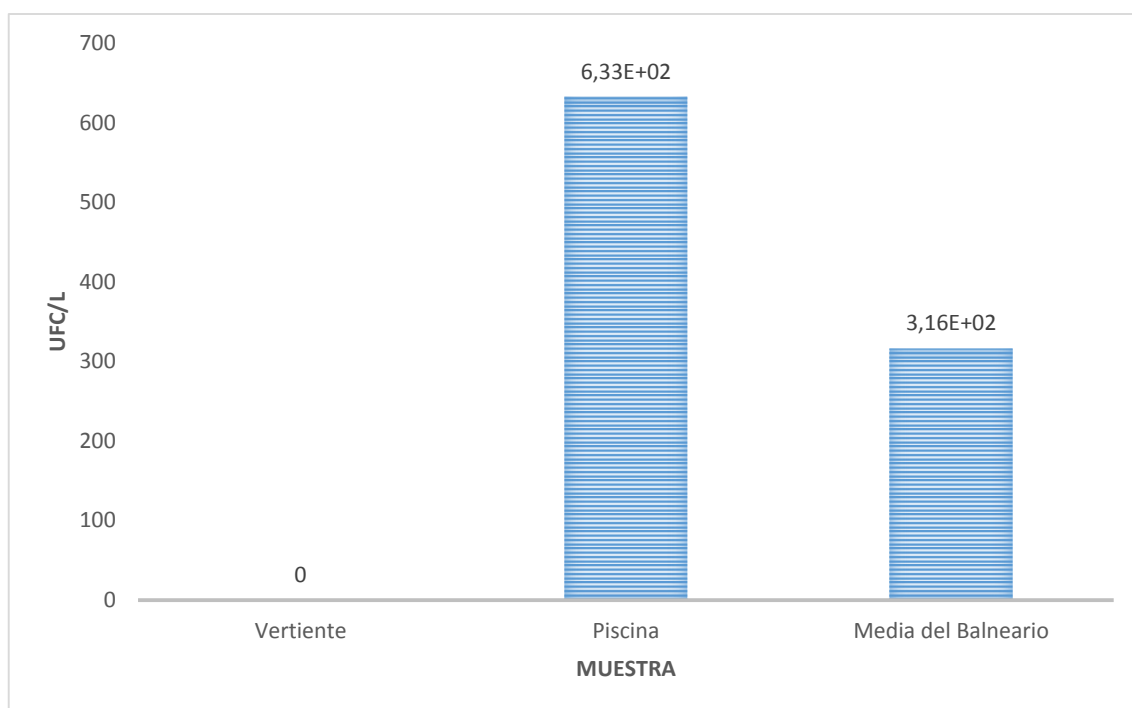
Los resultados de la muestra de la piscina por el contrario, muestran una gran contaminación de bacterias coliformes totales y fecales. El agua se puede contaminar por varias vías, entre las cuales la principal es el contacto con las personas, seguido de un mal mantenimiento de las instalaciones.

### 3.4 Resultado del conteo de bacterias *Staphylococcus aureus* presentes en la vertiente y piscina del Balneario Ecológico “Santa Ana”

**Tabla 4-3:** Resultados de análisis de *Staphylococcus aureus*

Muestra	Análisis	UFC/mL	Media
Vertiente	1	0	0
	2	0	
Piscina	1	$5,64 \times 10^2$	$6,33 \times 10^2$
	2	$7,01 \times 10^2$	
<b>Media del Balneario</b>			$3,16 \times 10^2$
<b>Varianza</b>			$1,36 \times 10^2$
<b>Desviación estándar</b>			$3,69 \times 10^2$

Fuente: MACAS, P. 2015



**Figura 3-3:** Recuento de *Staphylococcus* del Balneario “Santa Ana”

Fuente: MACAS, P, 2015

En la tabla 4-3 se puede apreciar los resultados del análisis microbiológico de *Staphylococcus aureus* de la muestra de la vertiente y la piscina. En la muestra de la vertiente no hubo crecimiento, mientras que en la muestra de la piscina hubo un notable crecimiento de bacterias cocos Gram positivos con una media de  $6,33 \times 10^2$  UFC/mL.

En el estudio microbiológico de las aguas del Balneario de La Toja, se encontraron pequeñas cantidades de *Staphylococcus*, mientras que en el presente trabajo en la muestra de la vertiente termal, no se encontró *Staphylococcus*, pero en la muestra de la piscina se reportó un crecimiento excesivo de estas bacterias, lo que indica que el agua está siendo contaminada por diferentes factores como el ambiente, el inadecuado mantenimiento de las instalaciones, etc. (DE LA ROSA et al., 1993, p. 89)

En la presente investigación, no se encontraron *Staphylococcus* en el agua de la vertiente termal, resultados similares a los del estudio microbiológico realizado en el Balneario de Alhama de Granada en 2002, donde no se encontraron estos microorganismos. Los resultados indican que la vertiente no sufre contaminación de microorganismos patógenos. (MOSSO et al., 2002, p. 62)

En el estudio microbiológico de las aguas mineromedicinales de los Balnearios de Jaraba, se reportó un número pequeño de *Staphylococcus* y ausencia de *Staphylococcus aureus* en la vertiente de aguas termales, resultados que concuerdan con los datos obtenidos en el presente estudio. (BELTRÁN, et al., 2004, p. 76)

En el estudio microbiológico a las aguas los manantiales mineromedicinales del Balneario Cervantes realizado en 2006, se reportó ausencia de *Staphylococcus aureus* y escasas bacterias del género *Staphylococcus*, datos similares a los obtenidos del agua de la vertiente termal del Balneario “Santa Ana”.

En el estudio titulado Microbiología del manantial mineromedicinal del Balneario Puente Viesgo, se obtuvo una baja proporción de *Staphylococcus* con una ausencia de *Staphylococcus aureus*, datos similares a los obtenidos en el presente trabajo, en donde no se encontraron *Staphylococcus* en la vertiente. (DE LA ROSA et al., 2007, p. 24)

En el presente estudio no se encontraron *Staphylococcus aureus*, al igual que en el estudio titulado Microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario de Valdelateja, donde no se reportó la presencia de *Staphylococcus aureus*. (MOSSO et al., 2008, p. 46)

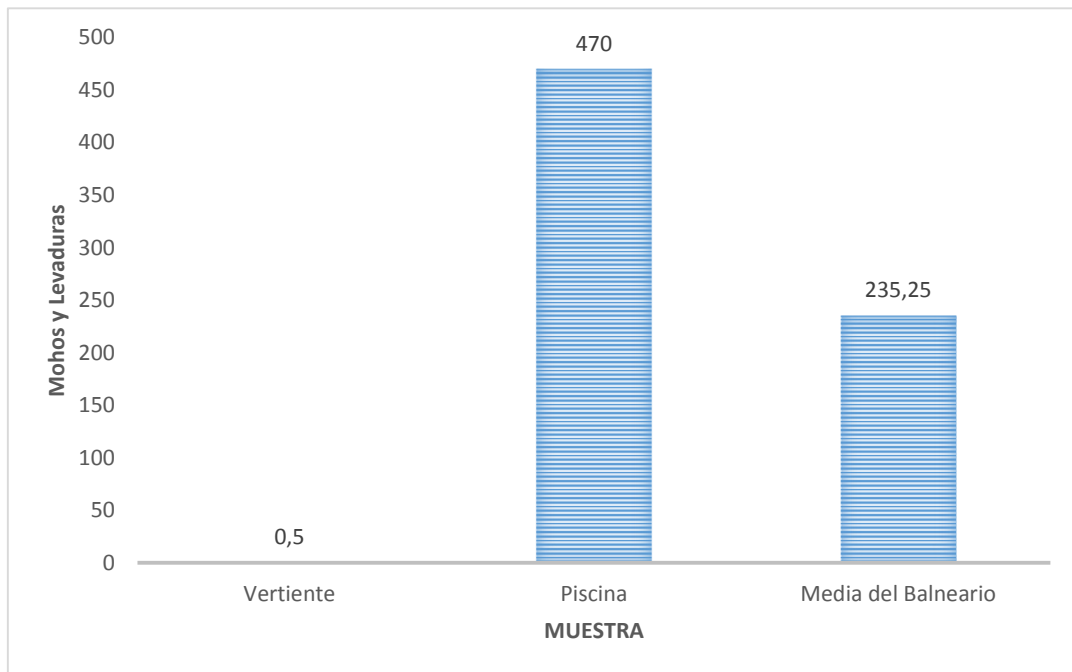
En la muestra de la piscina se encontró una gran cantidad de cocos Gram positivos, entre los cuales se logró aislar e identificar una cepa de bacterias *Staphylococcus aureus*. En vista de que la vertiente no está contaminada con este agente patógeno, la principal vía de contaminación del agua de la piscina son los turistas.

### 3.5 Resultado del conteo de Mohos y levaduras presentes en la vertiente y piscina del Balneario Ecológico “Santa Ana”

**Tabla 5-3:** Resultados de análisis de Mohos y Levaduras

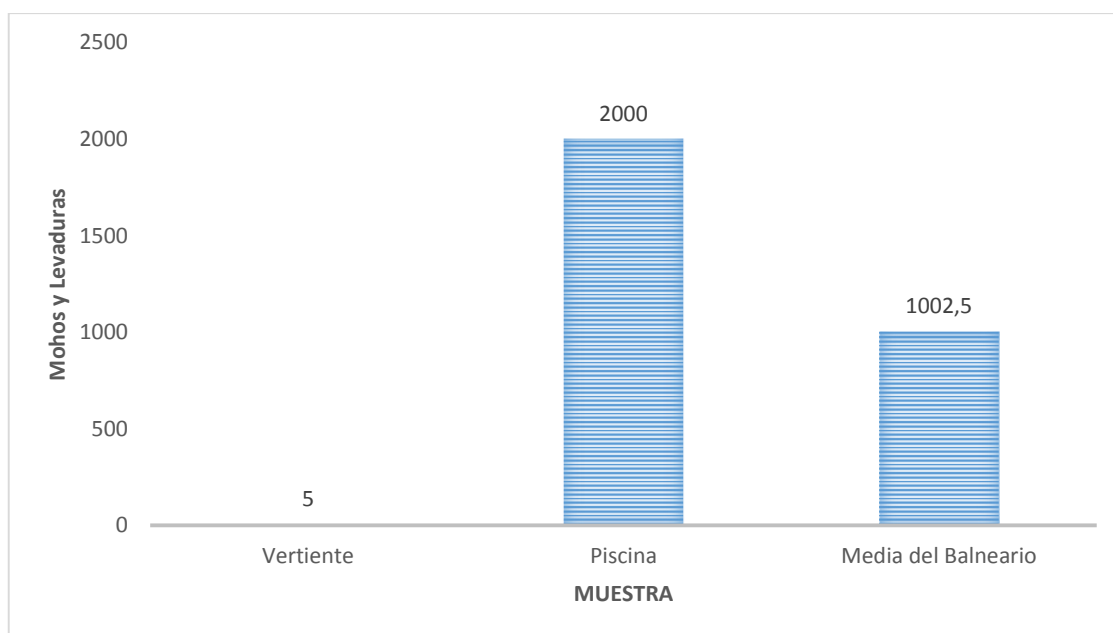
Muestra	Análisis	Mohos (UFC/mL)	Levaduras (UFC/mL)	Media Levaduras	Media Mohos
Vertiente	1	1	8	5,00E+00	5,00E-01
	2	0	2		
Piscina	1	5,40E+02	2,00E+03	2,00E+03	4,70E+02
	2	4,00E+02	2,00E+03		
<b>Media del Balneario</b>				6,19E+02	
<b>Varianza</b>				8,96E+05	
<b>Desviación estándar</b>				9,47E+02	

Fuente: MACAS, P. 2015



**Figura 4-3:** Recuento de Mohos del Balneario “Santa Ana”

Fuente: MACAS, P. 2015



**Figura 5-3:** Recuento de Levaduras del Balneario “Santa Ana”

Fuente: MACAS, P. 2015

En la tabla 5-3 se puede apreciar el número de mohos y levaduras a los 8 días de incubación, de las muestras analizadas de la vertiente y la piscina. En la muestra de la vertiente en el caso de los mohos, se encontró el crecimiento de una sola colonia en la muestra uno, y para el caso de las levaduras, se encontró el crecimiento de 10 colonias. En la muestra de la piscina se encontró un gran crecimiento de mohos y levaduras con una media de  $4,70 \times 10^2$  y  $2,00 \times 10^3$  UFC/mL respectivamente.

En el presente trabajo no se realizó el aislamiento e identificación de mohos y levaduras, solamente el conteo de colonias. Sin embargo, cabe mencionar que en estudios microbiológicos realizados en el Balneario de Alhama de Granada en 2002, se aisló e identificó a mohos que corresponden a *Mucor*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Syncephalastrum* y *Ulocladium*. También hubo el crecimiento de levaduras identificadas como *Candida lusitania*, *C. guilliermondii* y *Rhodotorula rubra*. (MOSSO et al., 2002, p. 52)

En el estudio titulado Microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario de Valdelateja, se detectó hongos filamentosos pertenecientes a los géneros *Penicillium*, *Fusarium* y *Cladosporium*, en el presente estudio se reportó la presencia de mohos y levaduras escasos en la vertiente. (MOSSO et al., 2008, p. 72)

En el estudio microbiológico de las aguas mineromedicinales de los Balnearios de Jaraba realizado en 2004, se encontró un escaso número de hongos y levaduras, al igual que en el presente estudio se reportó escasos mohos y levaduras en la vertiente del Balneario “Santa Ana”. (BELTRÍA et al., 2004, p. 81)

La presencia de mohos y levaduras es poco frecuente en las vertientes de aguas termales, pero en el estudio microbiológica de los manantiales mineromedicinales del Balneario de Alicún de las Torres, se reportó la presencia de hongos filamentosos, al igual que en el presente estudio. La presencia de mohos y levaduras en las aguas se debe al entorno, ya que estos proceden del suelo principalmente. (DE LA ROSA et al., 2009, p. 84)

En el estudio microbiológico de las aguas mineromedicinales del Balneario El Raposo realizado en 2013, se reportó escasa presencia de mohos y levaduras, datos similares al presente estudio, la presencia de estos microorganismos ya ha sido reportado en otros estudios, debido a que los hongos se encuentran en el suelo y son capaces de adaptarse a medios acuáticos.

Se han encontrado hongos filamentosos pertenecientes al género *Penicillium* en las aguas del manantial mineromedicinal del Balneario Puente Viesgo, resultados que concuerdan con los obtenidos de las aguas termominerales del Balneario “Santa Ana”. (DE LA ROSA et al., 2007, p. 61)

La presencia de mohos y levaduras en la vertiente puede ser a causa de contaminación del suelo o del ambiente, ya que la vertiente se encuentra expuesta sin protección. La presencia de mohos y levaduras en la muestra de la piscina, refleja contaminación que puede darse por parte de los bañistas, o la falta de mantenimiento de las instalaciones del balneario.

### 3.6 Características macroscópicas de las colonias aisladas de la vertiente y piscina del Balneario Ecológico “Santa Ana”

**Tabla 6-3:** Resultados de las características macroscópicas de las colonias aisladas de la vertiente y piscina

Muestra	Código cepa	Origen	Morfología de las colonias aisladas					
			Forma	Elevación	Superficie	Consistencia	Tamaño	Color
Vertiente	MV1-1	Placa Aerobios Totales	Irregular	Plana	Rugosa	Cremosa	2 mm	Rosácea
	MV1-2		Circular	Plana	Lisa	Cremosa	3 mm	Crema
	MV1-3		Circular	Elevada	Lisa	Cremosa	4 mm	Rosácea
	MV2-4		Irregular	Plana	Rugosa	Cremosa	2 mm	Rosácea
	MV2-5		Circular	Plana	Lisa	Cremosa	5 mm	Rosácea
	MV2-6		Irregular	Elevada	Lisa	Cremosa	2 mm	Rosácea
Piscina	MP1-7	Placa Aerobios Totales	Circular	Elevada	Lisa	Cremosa	4 mm	Blanca
	MP1-8	Placa Staph Express	Circular	Plana	Lisa	Cremosa	4 mm	Rosácea
	MP1-9		Irregular	Elevada	Lisa	Cremosa	3 mm	Rosácea
	MP1-10		Circular	Elevada	Lisa	Cremosa	4 mm	Blanca
	MP2-11	Placa <i>E. coli</i> /Coliformes totales	Circular	Plana	Lisa	Cremosa	3 mm	amarillenta
	MP2-12		Circular	Plana	Lisa	Cremosa	4 mm	amarillenta
	MP2-13		Circular	Plana	Lisa	Cremosa	4 mm	amarillenta
	MP2-14		Irregular	Elevada	Lisa	Cremosa	3 mm	Rosácea
	MP2-15	Placa Staph Express	Irregular	Plana	Lisa	Cremosa	2 mm	Amarilla
	MP2-16		Irregular	Plana	Lisa	Cremosa	3 mm	Amarilla
	MP2-17		Circular	Plana	Lisa	Cremosa	4 mm	Rosácea

Fuente: MACAS, P. 2015

**MV1-1:** Cepa 1-Análisis 1- muestra vertiente; **MV2-4:** Cepa 4-Análisis 2- muestra vertiente; **MP1-7:** Cepa 7-Análisis 1- muestra piscina; **MP2-11:** Cepa 11-Análisis 2- muestra piscina

En la Tabla 6-3 se aprecia la morfología de las 17 cepas microbianas, aisladas de la vertiente y la piscina. Las colonias de la vertiente se aislaron de la placa de aerobios totales, debido a que no hubo crecimiento microbiano en las demás. El Tamaño de las colonias de la vertiente y de la piscina fue de 2-5 mm, la mayoría de las colonias aisladas fueron de color rosáceo, con una superficie lisa, planas y una forma circular.

En la literatura se menciona la importancia de verificar la morfología macroscópica de las colonias, debido a que es un dato más en la tipificación taxonómica de microorganismos, y también es una medida de control para realizar una siembra correcta. Es por esto que en el presente estudio se han puesto las diferentes características macroscópicas de las colonias microbianas aisladas.

En la literatura se menciona la importancia del estudio de las características macroscópicas de las colonias para determinar los procedimientos de identificación a seguir. En el presente trabajo las características macroscópicas de las colonias proporcionaron datos preliminares en la identificación de los microorganismos aislados. (FORBES, 2009, p. 62)

En el presente trabajo se menciona la morfología macroscópica de las colonias aisladas, al igual que en el trabajo de tesis titulado Estudio microbiológico de las aguas termo-medicinales del Balneario “El Salado” de Baños de Agua Santa - Tungurahua, en el cual se describen las características macroscópicas y microscópicas de las colonias aisladas, considerándolas un factor importante dentro del estudio.

La descripción de las características macroscópicas de las colonias microbianas es un paso importante, que ayuda en la búsqueda de métodos de identificación de bacterias además de ser un dato más en la tipificación taxonómica de microorganismos.

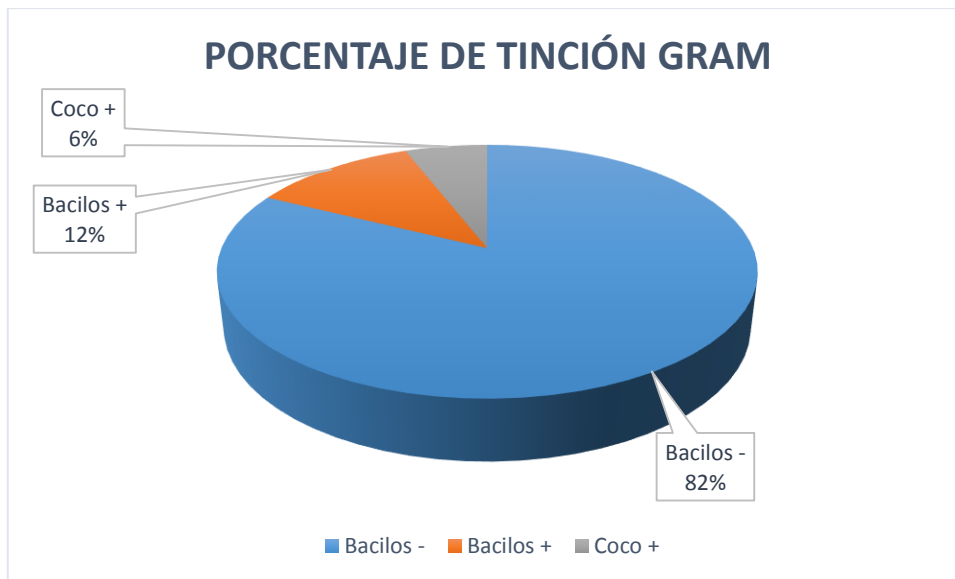
### 3.7 Morfología y propiedad tintorial de las colonias aisladas de la vertiente y Piscina del Balneario Ecológico “Santa Ana”

**Tabla 7-3:** Resultados de la tinción Gram de las cepas aisladas

Muestra	Placa origen	Código cepa	Tinción Gram	Porcentaje cepas (%) Tinción	
Vertiente	Placas 3M Petrifilm Aerobios totales	MV1-1	Bacilos -	82,35	
		MV1-2			
		MV1-3			
		MV2-4			
		MV2-5			
		MV2-6			
Piscina	Placas 3M Petrifilm Aerobios totales	MP1-7	Bacilos -	82,35	
		Placas 3M Petrifilm Staph Express			MP1-8
					MP1-9
					MP1-10
	Placas 3M Petrifilm E. coli/Coliformes	MP2-11	Bacilos -	82,35	
		MP2-12			
		MP2-13			
		MP2-14			
	Placas 3M Petrifilm Staph Express	MP2-15	Bacilos +	11,76	
		MP2-16			
MP2-17		Coco +	5,88		
Total cepas aisladas			17	100	

Fuente: MACAS, P. 2015





**Figura 6-3:** Bacterias Gram Positivas, Gram Negativas

Fuente: MACAS, P. 2015

La coloración Gram se realizó sobre 6 colonias aisladas de la Placa 3M Petrifilm para Aerobios totales en el caso de la muestra correspondiente a la vertiente. En la muestra perteneciente a la piscina, la coloración Gram se realizó sobre 4 colonias repicadas de la Placa 3M Petrifilm *E. coli*/Coliformes totales, 6 colonias repicadas de la Placa 3M Petrifilm Staph Express y 1 colonia repicada de la Placa 3M Petrifilm Aerobios totales. Luego de la tinción Gram se logró identificar a cada una de ellas.

Los resultados obtenidos en este trabajo son similares a los del estudio microbiológico de las aguas mineromedicinales de la Fuente Amarga (DE LA ROSA et al., 1985, p. 62), donde se aisló con mayor frecuencia bacilos Gram negativos. Sin embargo los resultados obtenidos, difieren con otros estudios microbiológicos, como el de las aguas del Balneario de Alhama de Granada, en donde se aisló e identificó bacterias Gram positivas 49.1%, y bacterias Gram negativas 20.7%. (MOSSO et al., 2002, p. 23)

En el estudio microbiológico de las aguas mineromedicinales del Balneario de Puente Viesgo en España, se determinó un mayor crecimiento de bacilos Gram negativos a temperaturas de 45°C, a pesar de que la temperatura del agua en el manantial fue de 34°C. En el presente estudio se aisló una mayor cantidad de bacilos Gram negativos de las aguas del Balneario “Santa Ana” que se encuentran a 38.3°C y 46.3°C en la piscina y la vertiente respectivamente. (LÓPEZ et al., 2007, p. 46)

En el estudio de la diversidad microbiana de las aguas minerales termales, determinaron que en aguas hipertermales se encuentran en mayor cantidad las bacterias Gram positivas, mientras que en aguas clasificadas como mesotermas se encuentran en mayor cantidad bacterias Gram negativas, esto difiere con los resultados obtenidos, ya que la vertiente termal del Balneario “Santa Ana” clasificada como hipertermales encontraron en mayor cantidad bacterias Gram negativas. (DE LA ROSA et al., 2000, p. 12)

En el estudio microbiológico de las aguas mineromedicinales de los Balnearios de Jaraba, se reportó un elevado porcentaje de bacilos Gram positivos en aguas con temperaturas de 29°C, mientras que en las aguas de la vertiente del Balneario “Santa Ana” con una temperatura de 46°C, se reportó una mayor cantidad de bacilos Gram negativos, esta diferencia puede ser debido a que la vertiente de “Santa Ana” se encuentra en contacto directo con el ambiente y puede contaminarse con microorganismos del suelo que sean capaces de adaptarse a medios acuáticos. (DE LA ROSA et al., 2000, p. 71)

En el estudio microbiológico de los manantiales mineromedicinales del Balneario de Baños de la Concepción, se reportó un alto porcentaje de bacilos Gram negativos en aguas con una temperatura de 28°C, lo que difiere de este estudio ya que a una mayor temperatura del agua se encontró un mayor porcentaje de bacilos Gram negativos. (MOSSO et al., 2011, p. 62)

En el estudio microbiológico de los manantiales mineromedicinales del Balneario de Alicún de las Torres, se reportó un gran porcentaje de bacilos Gram negativos en aguas a temperaturas de 34°C resultados diferentes a los obtenidos en el presente estudio, ya que en las aguas del Balneario “Santa Ana” clasificadas como hipertermales se reportó un mayor número de bacilos Gram negativos. (DE LA ROSA et al., 2009, p. 38)

La cantidad de bacterias Gram positivas y Gram negativas encontradas en cada fuente estudiada es diferente, porque cada vertiente termal posee una microbiota específica que se desarrolla en función de las características del entorno que le rodea y que es diferente para cada fuente termal.

### 3.8 Pruebas bioquímicas de bacilos Gram negativos aislados de la vertiente y piscina del Balneario Ecológico “Santa Ana”

**Tabla 8-3:** Resultados de pruebas bioquímicas de bacilos Gram negativos aislados de la vertiente y piscina del Balneario “Santa Ana”

Pruebas	Catalasa	Oxidasa	Hugh Leifsonn		Agar Kliger	Indol	Motilidad	Urea	Citrato	Crecimiento MacConkey	Crecimiento Eosina Azul de metileno
			O	F							
MVA1-1	+	+	-	-	-/+	-	-	-	+	+	+
MVA1-2	+	+	+	+	-/+	+	+	-	-	+	+
MVA1-3	+	+	-	-	-/+	-	+	+	+	+	+
MVA2-5	+	+	-	-	-/-	-	-	+	+	+	+
MVA2-6	+	+	-	-	-/-	-	-	-	+	+	+
MPA1-7	+	+	-	+	-/+	+	+	-	+	+	+
MPA1-8	+	+	-	-	-/+	-	-	-	-	+	+
MPA1-9	+	+	-	-	-/+	-	-	-	-	+	+
MPA1-10	+	+	-	-	-/+	-	+	+	+	+	+
MPA2-11	+	+	-	-	-/+	-	+	+	+	+	+
MPA2-12	+	+	-	-	-/-	-	-	+	+	+	+
MPA2-13	+	+	-	+	-/-	-	-	+	+	+	+
MPA2-14	+	+	-	-	+/+	-	+	-	-	+	+

Fuente: MACAS, P. 2015

En la tabla 8-3 se muestran las pruebas bioquímicas realizadas a las cepas de bacilos Gram negativos aislados de la vertiente y la piscina. Cada una de las cepas se logró identificar a nivel de género y especie, tomando en cuenta los resultados reportados del total de pruebas bioquímicas realizadas.

Para poder identificar el género y especie de las cepas aisladas se compararon las pruebas bioquímicas realizadas a cada cepa, con los esquemas de identificación para bacterias Gram negativas, descritas en el libro de Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica. (MACFADDIN, 2003, p. 461).

Los resultados de esta investigación son similares a los obtenidos en el trabajo de maestría Aislamiento, identificación y detección de microorganismos, con actividades biológicas, procedentes de las aguas de los manantiales termales de la Mitisús y Santa Apolonia del estado Mérida, donde los resultados obtenidos por las pruebas bioquímicas determinó que las cepas aisladas tienen un metabolismo no fermentativo como en la mayoría de las cepas aisladas del presente trabajo. (FLORES, 2013, p. 23)

La identificación de microorganismos por medio de pruebas bioquímicas también fue realizado en el estudio microbiológico del Balneario de Alhama de Granada, donde las pruebas realizadas fueron: catalasa, oxidasa, ureasa, reducción de nitratos, hidrólisis de la gelatina y almidón, que ayudaron a identificar y clasificar a los microorganismos. (MOSSO et al., 2002, p. 42)

En el estudio microbiológico realizado al agua los manantiales mineromedicinales del Balneario Cervantes, realizado por Romeo, en el año 2009, se describe las pruebas bioquímicas utilizadas en la identificación de los microorganismos como: prueba de la catalasa, oxidasa, oxidación-fermentación, reducción de nitratos y movilidad, similares a las pruebas bioquímicas aplicadas en la identificación de las cepas aisladas de las aguas termo-minerales del Balneario “Santa Ana”.

En el estudio microbiológico de las aguas mineromedicinales del Balneario de Puente Viesgo en España, se utilizaron pruebas bioquímicas para la identificación de microorganismos, similares a las pruebas realizadas en la presente investigación en la identificación de las cepas aisladas. (LÓPEZ et al., 2007, p. 23)

La identificación de las bacterias Gram negativas aisladas de las aguas termales del Balneario “Santa Ana” se realizó por medio de las características morfológicas y bioquímicas de los microorganismos, al igual que en el estudio microbiológico de los manantiales mineromedicinales del Balneario de Baños de la Concepción. (MOSSO et al., 2011, p. 24)

La tinción Gram y las pruebas bioquímicas de catalasa y oxidasa, constituyen la base de la identificación de cepas bacterianas aisladas, ya que a partir de estas se decide el método de identificación y tratamiento de los microorganismos a seguir. El compendio de pruebas bioquímicas realizadas en este estudio microbiológico, nos ha llevado a la identificación de las bacterias estudiadas.

### 3.9 Pruebas bioquímicas de bacterias Gram positivas aisladas de la vertiente y piscina del Balneario Ecológico “Santa Ana”

**Tabla 9-3:** Resultados de pruebas bioquímicas de bacilos Gram positivos aislados

<b>Pruebas</b>	<b>Catalasa</b>	<b>Oxidasa</b>	<b>Hidrolisis del almidón</b>	<b>Licuefacción de la gelatina</b>	<b>Fermentación Manitol Salado</b>	<b>Tinción Gram</b>
<b>Cepas</b>						
MPS1-15	+	-	+	-	-	Bacilos +
MPS1-16	+	-	+	-	-	Bacilos +
MPS2-17	+	-	N/A	N/A	+	cocos +

Fuente: MACAS, P. 2015

MP2-11: Cepa 11-Análisis 2- muestra piscina

En la tabla 9-3 se aprecia los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a las bacterias Gram positivas aisladas de la muestra de la piscina, entre las cuales están 2 cepas de bacilos Gram positivos y una cepa de cocos Gram positiva. Los bacilos se lograron identificar a nivel de género, y los cocos a nivel de género y especie.

En esta investigación se realizó pruebas bioquímicas similares a las usadas en el estudio microbiológico del Balneario de Alhama de Granada como: catalasa, oxidasa, hidrólisis de la gelatina y almidón. (MOSSO et al., 2002, p. 47)

En el trabajo de maestría titulado Aislamiento, identificación y detección de microorganismos, con actividades biológicas, procedentes de las aguas de los manantiales termales de la Mitisús y Santa Apolonia del estado Mérida, se lograron identificar tres cepas de bacterias Gram positivas a nivel de género, al igual que en el presente trabajo en el caso de los bacilos Gram positivos. (FLORES, 2013, p. 95)

En el presente estudio microbiológico la identificación de microorganismos se realizó por medio de las características morfológicas de las bacterias, con ayuda de la tinción Gram y las pruebas bioquímicas como: catalasa, oxidasa, oxidación-fermentación, y movilidad, pruebas similares a las realizadas en el estudio microbiológico de los manantiales mineromedicinales del Balneario Cervantes en 2009.

En el estudio microbiológico de las aguas mineromedicinales del Balneario de Puente Viesgo en España, se utilizaron pruebas bioquímicas para la identificación de microorganismos, similares a las pruebas realizadas en la presente investigación, en la identificación de las cepas aisladas de bacterias Gram positivas. (LÓPEZ et al., 2007, p. 42)

En el estudio microbiológico de los manantiales mineromedicinales del Balneario de Baños de la Concepción, se realizó la identificación de los microorganismos aislados, por medio de las características morfológicas y bioquímicas que estos mostraron, al igual que en la identificación de las cepas aisladas del agua termo-mineral del Balneario “Santa Ana”. (MOSSO et al., 2011, p. 42)

La identificación de las bacterias Gram positivas aisladas de las aguas termales del Balneario “Santa Ana” se realizó por medio de las características morfológicas y bioquímicas de los microorganismos, al igual que en la metodología utilizada en la identificación de los microorganismos del agua de los manantiales mineromedicinales del Balneario de Alicún de las Torres. (DE LA ROSA et al., 2009, p. 47)

Las características morfológicas y la utilización de pruebas bioquímicas como: catalasa, oxidasa, hidrólisis de la gelatina y almidón, ayudaron en la identificación de las bacterias cocos y bacilos Gram positivos de las cepas bacterianas aisladas de las aguas termo-minerales del Balneario “Santa Ana”.

### 3.10 Resultados del sistema de identificación de bacterias Microgen™ GnA+B-ID System

**Tabla 10-3:** Resultados cepa MV1-4

Cepa	MV1-4
<b>Reacción</b>	
Lisina	+
Ornitina	-
H <sub>2</sub> S	+
Glucosa	-
Manitol	-
Xilosa	-
ONPG	-
Indol	-
Ureasa	-
VP	-
Citrato	-
TDA	+
Gelatina	+
Malonato	-
Inositol	-
Sorbitol	-
Ramnosa	-
Sacarosa	-
Lactosa	-
Arabinosa	-
Adonitol	-
Rafinosa	-
Salicina	-
Arginina	+
Nitrato	+
Catalasa	+
Oxidasa	+

Fuente: MACAS, P. 2015

**MV1-4:** cepa 4 del análisis 1 de la Vertiente.

En la tabla 10-3 se puede observar los resultados obtenidos del sistema de identificación de bacterias Microgen™GnA+B-ID System, que se realizó para una cepa de bacterias Gram negativas aislada de la vertiente termo-mineral del Balneario “Santa Ana”, y se logró identificar a nivel de género y especie

En aislamiento, identificación y detección de microorganismos, con actividades biológicas, procedentes de las aguas de los manantiales termales de la Mitisús y Santa Apolonia del estado Mérida, para identificar las bacterias aisladas se utilizó el método de las pruebas API<sup>®</sup> 20 NE, que son similares al sistema de identificación de bacterias Microgen<sup>™</sup>GnA+B-ID System, ya que comparten gran cantidad de las pruebas, como las de: reducción de nitratos, indol, glucosa, ureasa, citrato, etc. (FLORES, 2013, p. 43)

El método de identificación usado en el presente trabajo también se relaciona con el método usado en el estudio microbiológico del Balneario de Alhama de Granada, en el cual la identificación de bacterias se realizó por medio el sistema de pruebas API<sup>®</sup> 20 NE, similares al sistema de identificación de bacterias Microgen<sup>™</sup>GnA+B-ID System. (MOSSO et al., 2002, p. 56)

En el estudio microbiológico realizado al agua los manantiales mineromedicinales del Balneario Cervantes, se utilizó el sistema de galerías API<sup>®</sup> 20NE (bioMérieux), API<sup>®</sup> 20E (bioMérieux), API Coryne (bioMérieux) y API Staph (bioMérieux), sistema de galerías multipuebas similar al utilizado en la identificación de microorganismos en el presente estudio.

En el estudio microbiológico de las aguas mineromedicinales del Balneario de Puente Viesgo en España, se identificaron los microorganismos con ayuda del sistema de identificación por pruebas bioquímicas miniaturizadas API<sup>®</sup> (bioMérieux), sistema de identificación similar al utilizado en el presente estudio. (LÓPEZ et al., 2007, p. 65)

En la presente investigación se identificó una cepa bacteriana aislada por medio del sistema de identificación de bacterias Microgen<sup>™</sup>GnA+B-ID System, sistema de galerías multipuebas similar al utilizado en el estudio microbiológico de los manantiales mineromedicinales del Balneario de Baños de la Concepción. (MOSSO et al., 2011, p. 45)

La identificación de la cepa bacteriana MV2-4 aislada del agua termo-mineral del Balneario “Santa Ana” se realizó por medio del sistema de identificación Microgen<sup>™</sup>GnA+B-ID System, método similar al utilizado en la identificación de los microorganismos del agua de los manantiales mineromedicinales del Balneario de Alicún de las Torres. (DE LA ROSA et al., 2009, p. 63)

El sistema de identificación de bacterias Microgen<sup>™</sup>GnA+B-ID System, es un sistema basado en celdillas aisladas con sustrato liofilizado, que permite realizar múltiples pruebas. Por medio de este sistema de identificación rápido y sencillo se logró identificar una cepa bacteriana de la vertiente termo-mineral del Balneario “Santa Ana”

### 3.11 Géneros y especies bacterianas identificadas de las colonias aisladas de la vertiente y piscina del Balneario Ecológico “Santa Ana”

**Tabla 11-3:** Resultados de géneros y especie bacteriana identificados de las colonias aisladas

Análisis	Códigos cepas	Géneros y especie	Porcentaje [%] de coincidencia de las	Géneros aislados	Porcentaje [%] de géneros	
1	MVA1-1	<i>Flavobacterium aquatile</i>	87,5	<i>Flavobacterium</i>	33,33	
	MVA1-2	<i>Aeromonas eucrenophila</i>	100			
	MVA1-3	<i>Aeromonas media</i>	87,5			
2	MVA2-5	<i>Flavobacterium aquatile</i>	87,5	<i>Aeromonas</i>	50	
	MVA2-6	<i>Aeromonas media</i>	100			
	MVA2-4	<i>Shewanella putrefaciens</i>	99,17	<i>Shewanella</i>	16,67	
1	MPA1-7	<i>Aeromonas caviae</i>	100	<i>Aeromonas</i>	72,73	
	MPA1-8	<i>Aeromonas media</i>	87,5			
	MPA1-9		87,5			
	MPA1-10		87,5			
	MPS1-15	<i>Bacillus spp.</i>	83,3	<i>Bacillus</i>		18,18
	MPS1-16		83,3			
2	MPA2-12	<i>Aeromonas media</i>	87,5	<i>Staphylococcus</i>	9,09	
	MPA2-13		87,5			
	MPA2-14	<i>Aeromonas schubertii</i>	87,5			
	MPA2-11		87,5			
	MPS2-17	<i>Staphylococcus aureus</i>	100			
<b>Total géneros encontrados</b>			17	100		

Fuente: MACAS, P. 2015

**MV1-1:** Cepa 1-Análisis 1- muestra vertiente; **MV2-4:** Cepa 4-Análisis 2- muestra vertiente; **MP1-7:** Cepa 7-Análisis 1- muestra piscina; **MP2-11:** Cepa 11-Análisis 2- muestra piscina

En la tabla 11-3 se pueden apreciar los géneros y especies bacterianas aisladas de la muestra de la vertiente y piscina. Se lograron identificar las 17 cepas bacterianas con la ayuda de las pruebas bioquímicas y del sistema de identificación de bacterias Microgen™GnA+B-ID System.



Las dos cepas de bacilos Gram positivos aisladas de la muestra de la piscina, se identificaron solamente a nivel de género, con ayuda de las pruebas bioquímicas. Las trece cepas de bacilos Gram negativos aisladas de la muestra de la vertiente y la piscina, se identificaron a nivel de género y especie con ayuda de las pruebas bioquímicas.

Una cepa de cocos Gram positivos aislada de la muestra de la piscina, se logró identificar a nivel de género y especie con ayuda de las pruebas bioquímicas. Una cepa de bacilos Gram negativos aislada de la muestra de la vertiente, se logró identificar a nivel de género y especie con ayuda del sistema de identificación de bacterias Microgen™GnA+B-ID System.

En el presente estudio se aislaron cinco géneros de bacterias que son: *Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Staphylococcus aureus*, *bacillus* y *Shewanella*. En el primer análisis realizado a la muestra de la vertiente, se obtuvieron tres cepas aisladas, del género *Flavobacterium*, y dos del género *Aeromonas*.

En el segundo análisis realizado a la muestra de la vertiente, se obtuvieron tres cepas aisladas, una del género *Flavobacterium*, una del género *Aeromonas* y una del género *Shewanella*. En los dos análisis realizados a las cepas aisladas de la vertiente, se encontró con mayor frecuencia el género *Aeromonas* con un (50%), seguido del género *Flavobacterium* con un (33.33%) y finalmente el género *Shewanella* con un (16.67%).

En el primer análisis realizado a la muestra de la piscina, se obtuvieron seis cepas aisladas, de las cuales cuatro corresponden al género *Aeromonas*, y dos al género *bacillus spp.* En el segundo análisis realizado a la muestra de la piscina, se obtuvieron cinco cepas aisladas, de las cuales, cuatro corresponden al género *Aeromonas*, y una al género *Staphylococcus*.

En los dos análisis realizados a las cepas aisladas de la piscina, se encontró con mayor frecuencia el género *Aeromonas* con un (72.73%), seguidamente se encontró el género *bacillus spp.* con un (18.2%) y finalmente el género *Staphylococcus* con un (9.09%).

En el estudio de la diversidad microbiana de las aguas minerales termales, se describen los géneros bacterianos más encontrados en las aguas termales, de los cuales los géneros *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Aeromonas* y *Flavobacterium*, coinciden con los encontrados en las aguas termales del Balneario “Santa Ana”. (DE LA ROSA et al., 2000, p. 73)

Las cepas aisladas e identificadas del agua termo-mineral del Balneario “Santa Ana”, con los géneros *bacillus* y *Staphylococcus* coinciden con los encontrados en el estudio microbiológico del Balneario de Alhama de Granada. (MOSSO et al., 2002, p. 43)

En el trabajo de maestría Aislamiento, identificación y detección de microorganismos, con actividades biológicas, procedentes de las aguas de los manantiales termales de la Mitisús y Santa Apolonia del estado Mérida, se aisló la bacteria *Shewanella putrefaciens* entre otros, al igual que en el presente trabajo. (FLORES, 2013, p. 55)

En el estudio microbiológico de las aguas mineromedicinales de Fuente Amarga, se aislaron géneros de *Staphylococcus* y *bacillus* que suelen hallarse frecuentemente en hábitats acuáticos. (DE LA ROSA et al., 1985, p. 43)

En el estudio microbiológico de los manantiales mineromedicinales del Balneario de Alicún de las Torres, se encontró con mayor frecuencia la especie *Aeromonas hydrophila*, también se encontró bacterias del género *Staphylococcus* en menor proporción. (DE LA ROSA et al., 2009, p. 34)

En el estudio microbiológico de los manantiales mineromedicinales del Balneario de Baños de la Concepción en 2011, se encontró la especie *Aeromonas hydrophila*, el género *Staphylococcus* y *bacillus*.

En el presente trabajo la especie *Aeromonas* media fue encontrada con mayor frecuencia, seguida de la especie *Aeromonas schubertii*, *Aeromonas eucrenophila* y finalmente *Aeromonas caviae*. Las especies del género *Flavobacterium* corresponden a: *Flavobacterium Aquatile*. También se aisló una especie de *Shewanella putrefaciens*. Los géneros encontrados son comunes en aguas termales, por lo que están en concordancia con los datos bibliográficos.

El género *bacillus spp* y las especies bacterianas identificadas como *Staphylococcus aureus* se han identificado de las muestras de la piscina, pudiendo ser parte de la contaminación o también de la flora autóctona de la vertiente termal del Balneario “Santa Ana”. En múltiples estudios se han reportado un mayor número de bacterias del género *Bacillus* en aguas hipertermales y escasos del género *Staphylococcus*.

### 3.12 Antibiograma de bacilos Gram positivos

**Tabla 12-3:** Resultados de Antibiograma de las especies bacterianas identificadas

Cepas aisladas				Antibióticos														
Muestra	Análisis realizados	Géneros y especie	Códigos	Trimetoprim 1,25mcg/ sulfametoxazol	Ceftriaxona 30mcg	Amoxicilina/ácido clavulánico	Imipenem 10 mcg	Cefalotina 30mcg	Gentamicina 10mcg	Ampicilina 10mcg	Kanamicina 30mcg	Penicilina G 10 U	Azitromicina 15mcg	Vancomicina 30mcg	Oxaciclina 1mcg	Eritromicina 15mcg	Novobiocina 30mcg	Ciprofloxacina 5mcg
Vertiente	1	<i>Flavobacterium aquatile</i>	MVA1-1	S	S	S	S	R	S	S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		<i>Aeromonas eucrenophila</i>	MVA1-2	S	S	R	S	R	S	R	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		<i>Aeromonas media</i>	MVA1-3	S	S	R	S	R	S	R	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	2	<i>Aeromonas media</i>	MVA2-6	S	S	R	S	R	S	R	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Piscina	1	<i>Aeromonas caviae</i>	MPA1-7	S	S	S	S	S	S	S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		<i>Bacillus spp.</i>	MPS1-15	ND	ND	ND	ND	ND	S	S	ND	S	S	ND	S	S	S	S
			MPS1-16	ND	ND	ND	ND	ND	S	S	ND	S	S	ND	S	R	S	S
	2	<i>Aeromonas schubertii</i>	MPA2-11	S	S	S	S	R	S	R	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		<i>Aeromonas media</i>	MPA2-12	S	S	R	S	R	S	R	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
			MPA2-13	S	S	R	S	R	S	R	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	<i>Staphylococcus</i>	MPS2-17	ND	ND	ND	ND	ND	S	ND	S	S	S	S	S	ND	ND	ND	

Fuente: MACAS, P. 2015

**R:** resistente; **S:** sensible; **NR:** no resultados; **ND:** No determinado; **MV1-1:** Cepa 1- Análisis 1- muestra vertiente; **MV2-6:** Cepa 6- Análisis 2- muestra vertiente; **MP1-7:** Cepa 7 Análisis 1- muestra piscina; **MP2-11:** Cepa 11- Análisis 2- muestra piscina

En la Tabla 12-3 se puede apreciar que las cepas aisladas son sensibles a la mayoría de antibióticos. Las especies de *Staphylococcus aureus*, *Aeromonas caviae* y la cepa MP2-15 del género *Bacillus* son 100 % sensibles a los antibióticos utilizados.

Se puede observar que las especies de *Aeromonas eucrenophila*, *Aeromonas media* y *Aeromonas schubertii* son sensibles a los siguientes antibióticos: trimetoprim/sulfametoxazol, ceftriaxona, imipenem, gentamicina, y resistentes a: amoxicilina/ácido clavulánico, cefalotina y ampicilina, a excepción de la especie *Aeromonas schubertii* que también es sensible a amoxicilina/ácido clavulánico. La cepa MP2-16 del género *Bacillus* es sensible a la mayoría de antibióticos usados excepto para Eritromicina. La cepa de *Flavobacterium aquatile* es sensible para todos los antibióticos usados, excepto para cefalotina.

En el trabajo de maestría Aislamiento, identificación y detección de microorganismos, con actividades biológicas, procedentes de las aguas de los manantiales termales de la Mitisús y Santa Apolonia del estado Mérida, realizado por la licenciada Flores, todas las cepas estudiadas fueron sensibles para siete de ocho antibióticos utilizados. (FLORES, S. 2013, p. 47)

En el trabajo titulado resistencia a los antibióticos en cepas de *Escherichia coli* aisladas de los manantiales de agua en la Región de Al-Ahsa publicado por Alzahrani y col. se observó que de veintiséis cepas, quince mostraron resistencia a la ampicilina, cloranfenicol, estreptomina, tetraciclina, cotrimoxazol, ácido nalidíxico y ciprofloxacina. (ALZHRANI, A. 2011, p. 124)

En el trabajo titulado prevalencia de la resistencia a los antimicrobianos de *Pseudomonas aeruginosa* en un manantial de agua dulce contaminada con aguas residuales domésticas, realizado por Ullah y col., se mostró que de cien cepas de *Pseudomonas aeruginosa* analizadas, noventa y nueve cepas fueron resistentes a dos o más antibióticos.

En el trabajo titulado *Flavobacterium odoratum*: a species resistant to a wide range of antimicrobial agents, realizado por Holmes y col, se registró que el microorganismo *Flavobacterium odoratum* fue resistente a los siguientes antimicrobianos: estreptomina, kanamicina, gentamicina, amikacina, carbenicilina, cefaloridina, ácido nalidíxico, sulfametoxazol, tetraciclina, cloranfenicol, ampicilina y tobramicina. En las cepas de *Flavobacterium* aisladas del agua termo-mineral del Balneario "Santa Ana", se identificó la resistencia al antibiótico cefalotina, que pertenece al grupo de las cefalosporinas al igual que el antibiótico cefaloridina mencionado anteriormente.

En el estudio de susceptibilidad antimicrobiana de flavobacterias realizado por Chang y col, la mayoría de antimicrobianos demostraron actividades pobres contra la bacteria *Flavobacterium meningosepticum*, entre los cuales se encuentra el antibiótico cefalotina, al igual que en el presente estudio la bacteria *Flavobacterium aquatile* es resistente a la cefalotina. (CHANG, J. 1997, P. 1302)

La resistencia a los antibióticos antes mencionados puede ser a causa de una mutación genética producida por la exposición de las bacterias a los antibióticos durante el ensayo, ya que muchas bacterias poseen la capacidad de producir betalactamasas responsables de la resistencia a las aminopenicilinas. Por otra parte las bacterias también pudieran adquirir esa resistencia del entorno que les rodea.

Los estudios de sensibilidad a los antibióticos de muestras de aguas termales son escasos y no existe un reglamento al respecto, lo que resulta en un gran problema, ya que la flora acuática está siendo afectada y tiene un papel muy importante en la difusión de la resistencia a los diferentes antibióticos.

## CONCLUSIONES

Se concluye que los parámetros físico-químicos del agua de la vertiente y piscina del Balneario “Santa Ana” fueron los siguientes: temperatura de la vertiente 46.3°C y de la piscina 38.3°C, el pH de la vertiente fue de 7.3 y de la piscina 7. Los sólidos totales disueltos de la vertiente y la piscina fueron mayores a 2000 ppm, y la conductividad del agua de la vertiente y piscina fueron mayores a 3999  $\mu S/cm$  parámetros similares al Balneario “El Salado” ubicado en Baños de Agua Santa.

Utilizando el método de las Placas 3M Petrifilm específico para cada tipo de microorganismo, en la vertiente del Balneario “Santa Ana”, se cuantificó el crecimiento de bacterias aerobias totales con una media de  $1,23 \times 10^2$  UFC/mL, mohos y levaduras con una media de 0.5 y 5 respectivamente. En la muestra de la piscina, se cuantificó el crecimiento de bacterias, en las placas para aerobias totales con una media de  $2,00 \times 10^3$  UFC/mL, mohos y levaduras con una media de  $4,70 \times 10^2$  UFC/mL y  $2,00 \times 10^3$  UFC/mL respectivamente, Staph Express con una media de  $6,33 \times 10^2$  UFC/mL, coliformes fecales y totales con una media de 56,5 y  $1,13 \times 10^3$  UFC/mL, respectivamente.

Se realizó la tinción Gram a 17 cepas bacterianas aisladas de la vertiente y piscina del Balneario “Santa Ana”, de las cuales 14 cepas (82.35%) resultaron ser bacilos Gram negativos, bacilos Gram positivos 2 (11.76%) y cocos Gram positivos 1 (5.88%), concluyendo que en el Balneario “Santa Ana” predominan las bacterias Gram negativas.

La microbiota autóctona del Balneario Ecológico “Santa Ana”, está constituida por especies de *Flavobacterium aquatile*, *Aeromonas eucrenophila*, *Aeromonas media*, *Shewanella putrefaciens*, *Aeromonas schubertii*, *Aeromonas caviae*, *Staphylococcus aureus* y *bacillus spp.*

Utilizando el método de pruebas bioquímicas y el sistema de identificación de bacterias Microgen™ GnA+B-ID System, se identificó a 15 cepas a nivel de género y especie, y a dos a nivel de género, de las muestras de agua de la vertiente y la piscina del Balneario “Santa Ana”. Las especies identificadas de las cepas aisladas de la vertiente fueron *Flavobacterium aquatile*, *Aeromonas eucrenophila*, *Aeromonas media* y *Shewanella putrefaciens*. Las especies encontradas con mayor frecuencia fueron *Aeromonas media* y *Flavobacterium aquatile*.

Las especies identificadas de las cepas aisladas de la piscina fueron *Aeromonas media*, *Aeromonas schubertii*, *Aeromonas caviae* y *Staphylococcus aureus*. A nivel de género únicamente, se identificó *bacillus spp*. La especie aislada con mayor frecuencia fue *Aeromonas media*.

Se concluye que las especies bacterianas *Staphylococcus aureus* y *Aeromonas caviae* aisladas de la muestra de agua de la piscina, son sensibles a todos los antibióticos a los que fueron sometidas: gentamicina, kanamicina, penicilina, azitromicina vancomicina, oxaciclina, trimetoprim/sulfametoxazol, ceftriaxona, imipenem, gentamicina amoxicilina/ácido clavulánico, cefalotina y ampicilina respectivamente.

Las cepas MP2-15 y MP2-16 del género *bacillus spp* aisladas de la muestra de agua de la piscina son sensibles a los antibióticos gentamicina, ampicilina, penicilina, azitromicina, oxaciclina, eritromicina, novobiocina y ciprofloxacina, excepto Eritromicina en el caso de la cepa MP2-15.

La cepa MV1-2 de la especie *Aeromonas eucrenophila*, MV1-3, MV2-6, MP2-12, MP2-13 de la especie *Aeromonas media* y MP2-11 de la especie *Aeromonas schubertii* son sensibles a los antibióticos trimetoprim/sulfametoxazol, ceftriaxona, imipenem, gentamicina, y resistentes a amoxicilina/ácido clavulánico, cefalotina y ampicilina, a excepción de la especie *Aeromonas schubertii* que también es sensible a amoxicilina/ácido clavulánico.

Este es el primer estudio microbiológico realizado en las aguas termales del Balneario Ecológico “Santa Ana” y con los resultados obtenidos se puede concluir que la vertiente de agua del balneario no está contaminada ya que el crecimiento de bacterias en los medios de cultivo es escaso. Al contrario de la vertiente, en la piscina se encontró un gran crecimiento de bacterias aerobias mesófilas, coliformes totales y fecales, *Staphylococcus*, mohos y levaduras, lo que indica una gran contaminación.

## **RECOMENDACIONES**

Realizar más estudios microbiológicos que ayuden a determinar la microbiota autóctona de cada una de las vertientes termales del Balneario “Santa Ana”.

Realizar estudios microbiológicos de actividades enzimáticas antimicrobianas y antifúngicas de las bacterias autóctonas.

Hacer análisis microbiológicos periódicos del agua de las piscinas y de la vertiente termal, para controlar el nivel de contaminación y en base a esto se puedan tomar correctivos.

Se recomienda que el personal que labora en el establecimiento turístico se realice controles médicos periódicamente, para evitar un posible foco de contaminación.

La implementación de un pediluvio de acuerdo al número y distancia de las piscinas, para favorecer la desinfección de los pies y evitar una mayor contaminación.

Aislar las vertientes de aguas termales para evitar su contaminación con agentes externos y renovar el sistema de tuberías, para que la calidad del agua termal se mantenga de la vertiente a la piscina.

Cambiar el material del que están hechas las piscinas, preferentemente utilizar materiales lisos antideslizantes, impermeables, resistentes de fácil limpieza y desinfección.



## BIBLIOGRAFÍA

**ALARCÓN, L. et al.** *Manual de prácticas de Microbiología y Microbiología de alimentos* [en línea]. Juárez-México: Mayola Renova Gonzáles, 2004, pp. 13-40 [Consulta: 18 mayo 20015] Disponible en: [https://books.google.com/books?id=OykG04CIBUC&pg=PA2&lpg=PA2&dq=Alarcon,+manua+l+de+practic+de+microbiologia+general+y&source=bl&ots=j\\_NwGxNQgk&sig=V1nDrQo7AISM86pmNWgliAHGubI&hl=es&sa=X&ved=0CB0Q6AEwAGoVChMIsp2O98rfxgIVCqoeCh3Pbg-g](https://books.google.com/books?id=OykG04CIBUC&pg=PA2&lpg=PA2&dq=Alarcon,+manua+l+de+practic+de+microbiologia+general+y&source=bl&ots=j_NwGxNQgk&sig=V1nDrQo7AISM86pmNWgliAHGubI&hl=es&sa=X&ved=0CB0Q6AEwAGoVChMIsp2O98rfxgIVCqoeCh3Pbg-g)

**ALVAREZ, M. et al.** *Manual de técnicas en microbiología clínica*, 2da. ed. Madrid-España. Asociación Española de Farmacéuticos Analistas, 1990, pp. 111-112

**ALZHRANI, A. et al.** *Antibiotic resistance in Escherichia coli strains isolated from water springs in Al-Ahsa Region*, vol 5, n° 2 (2011),(África) pp. 124-130.

**ANDERSON, M. et al.** *Microbiología Alimentaria: Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas* [en línea]. 2da. ed. Madrid-España, 2000, pp25-30. [Consulta: 11 febrero 20015] Disponible en: [https://books.google.com.ec/books?id=9EIfkks8uxMC&printsec=frontcover&hl=es&source=gb\\_s\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.ec/books?id=9EIfkks8uxMC&printsec=frontcover&hl=es&source=gb_s_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)

**BAÑOS, R.** *Ecuador es tuyo... Descúbrelo Baños de Agua Santa*. (2010), [en línea] Efecé Publicaciones, 2010, [Consulta: 2 mayo 20015] Disponible en: <http://revistabanios.wordpress.com/acerca-de/>

**CAMACHO, A. et al.** Bienes y servicios. Metodo para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos [en línea]. 2da ed. D.F-México, Facultad de México, (1994). [Consulta: 24 mayo 20015]. Disponible en: [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TecnicBasicas-Cuenta-mohos-levaduras\\_6530.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TecnicBasicas-Cuenta-mohos-levaduras_6530.pdf)

**CAVALLINI, E.R.** *Bacteriología general: principios y prácticas de laboratorio* [en línea]. San José-Costa Rica, Editorial Universidad de Costa Rica (2005), pp: 63-65. [Consulta: 2 marzo 20015] Disponible en:

[https://books.google.com.pe/books?id=vwB0fgirgN0C&printsec=frontcover&hl=es&source=books\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.pe/books?id=vwB0fgirgN0C&printsec=frontcover&hl=es&source=books_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)

**CHANG, J.C.; HSUEH, P.R. et al.** “Antimicrobial susceptibility of avobacteria as determined by agar dilution and disk diffusion methods” [en línea]. *National Institutes of Health*, vol. 4, n°6 (1997), (USA), pp. 1301-1305. [Consulta: 2 marzo 20015]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC163904/pdf/411301.pdf>

**CLAPES, B.** “Control de calidad de las aguas minero medicinales” *.Panorama Actual de las Aguas Minero-medicinales en España*, [en línea], (2000), Madrid-España, vol 5, n° 3 pp. 75-90. [Consulta: 2 febrero 20015]. Disponible en: [http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/rehabilitacion/oliver-rodes\\_cb.pdf](http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/rehabilitacion/oliver-rodes_cb.pdf)

**DE LA ROSA, María del Carmen et al.**, “Microbiología de las aguas mineromedicinales de los Balnearios de Jaraba.”, *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia.*, vol. 70, (2004), Madrid-España., Pp. 521-542.

**DE LA ROSA, J. et al.** “Microbiología del manantial mineromedicinal del Balneario de Puente Viesgo”. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia.*, vol. 73, n° 28 (2007), (Madrid-España), Pp. 254-261

**DE LA ROSA, J. et al.** “Microbiología de las aguas mineromedicinales del Balneario La Toja.”. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia.*, vol. 19, n° 10 (1993), (Madrid-España), Pp. 17-22

**DE LA ROSA, J. et al.** “Microbiología de las aguas mineromedicinales del Balneario Alicún de las Torres”. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia.*, vol. 75, n° 1 (2009), (Madrid-España), Pp. 45-54.

**DE LA ROSA, J. et al.** “Diversidad microbiana de las aguas minerales termales”. *Panorama Actual de las Aguas Minero-medicinales en España.*, vol. 64, n° 3 (2000), (Madrid-España), Pp. 153-157.

**FAGUNDO, J. et al.** *Revisión bibliográfica sobre clasificación de las aguas minerales y mineromedicinales*, [en línea]. La Habana-Cuba, Contribución a la Educación y Protección Ambiental, 2001, pp. 1-5 [Consulta: 2 febrero 20015]. Disponible en: <http://www.fagundojr.com/index.php?IDPagina=>

**FAGUNDO, J. et al.** *Historia del desarrollo del Termalismo y Termalismo Moderno* [en línea]. Habana-Cuba., Conferencias impartidas en el curso de termalismo, Centro Nacional de Medicina Natural y Tradicional, 2000., Pp. 2-5. [Consulta: 24 marzo 20015] Disponible en: [http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/mednat/curso\\_de\\_termalismo.pdf](http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/mednat/curso_de_termalismo.pdf)

**FAO.** Manual de procedimientos para el control microbiológico de alimentos, Roma, 1992. [Consulta: 25 abril 20015]. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-t0451s.pdf>

**FASEB J.** “Ribosomal RNA: a key to phylogeny”. *Universidad de Illinois* [en línea], (1993) Illinois-USA, vol 7, n°1, pp: 113-23. [Consulta: 2 febrero 20015]. Disponible en: <http://academic.uprm.edu/~lrios/4368/Olsen-Woese.pdf>

**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 Mérida.*, (TESIS), Maestría en Química de medicamentos, Universidad de Los Andes. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Mérida-Venezuela., 2013, pp 46-75.

**FORBES, B.A.** *Diagnostico microbiológico.* 12va ed. Buenos Aires-Argentina. Panamericana, 2009, pp. 78-119

**GAMAZO, C. et al.** *Manual práctico de Microbiología*, [en línea]. 3ra ed. Barcelona-España. Elsevier, 2005, pp. 125-140. [Consulta: 2 febrero 2015]. Disponible en:

[https://books.google.com.ec/books/about/Manual\\_pr%C3%A1ctico\\_de\\_microbiolog%C3%ADa.html?id=MfW3TuHLa4gC](https://books.google.com.ec/books/about/Manual_pr%C3%A1ctico_de_microbiolog%C3%ADa.html?id=MfW3TuHLa4gC)

**GARCÍA, P. et al.** *Microbiología clínica práctica*, [en línea]. 2da ed. Cádiz-España. Universidad de Cádiz, 1993, pp. 106-134. [Consulta: 10 febrero 2015]. Disponible en:

[https://books.google.com.ec/books?id=4N8qVKckrUUC&printsec=frontcover&dq=microbiologia+clinica+practica,+garcia&hl=es&sa=X&ved=0CBsQ6AEwAGoVChMIko\\_6s\\_ffxgIVk36SCh1UywFR#v=onepage&q=microbiologia%20clinica%20practica%2C%20garcia&f=false](https://books.google.com.ec/books?id=4N8qVKckrUUC&printsec=frontcover&dq=microbiologia+clinica+practica,+garcia&hl=es&sa=X&ved=0CBsQ6AEwAGoVChMIko_6s_ffxgIVk36SCh1UywFR#v=onepage&q=microbiologia%20clinica%20practica%2C%20garcia&f=false)

**GARCIA, V.** *Introducción a la microbiología* [en línea]. 2da ed., Costa Rica, EUNED, 2009, pp. 85-104. [Consulta: 11 febrero 2015]. Disponible en:

<https://books.google.com.ec/books?id=KFq4oEQQjdEC&pg=PA33&dq=introduccion+a+la+microbiologia,+garcia&hl=es419&sa=X&ved=0CB8Q6AEwAWoVChMIktqjqPnfxgIVTgmSch1E4wGK#v=onepage&q=introduccion%20a%20la%20microbiologia%2C%20garcia&f=false>

**GETA, J. et al.** *Panorama actual de las aguas minerales y minero-medicinales en España*, [en línea]. Madrid-España. IGME, 2000, pp. 160-180 [Consulta: 11 febrero 2015]. Disponible en:

[https://books.google.com.ec/books?id=crEeo9TWbF0C&printsec=frontcover&hl=es&source=google\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.ec/books?id=crEeo9TWbF0C&printsec=frontcover&hl=es&source=google_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)

**HANNA INSTRUMENTS.** Medidor multiparámetro portátil [en línea]. Chile, 2010. [Consulta: 23 abril 2015]. Disponible en:

<http://www.hannachile.com/productos/multiparametro/multiparametros-portatiles/medidor-multiparametro>

**HERNÁNDEZ, F.** *Fundamentos de epidemiología: el arte detectivesco de la investigación epidemiológica*, [en línea]. San José-Costa Rica. EUNED, 2002, pp. 10-20. [Consulta: 11 mayo 20015]. Disponible en:

[https://books.google.com.ec/books?id=vu7xOb6X\\_qkC&printsec=frontcover&hl=es&source=gs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.ec/books?id=vu7xOb6X_qkC&printsec=frontcover&hl=es&source=gs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)

**HOLMES, B. et al.** “Flavobacterium odoratum: a species resistant to a wide range of antimicrobial agents”. *Journal of clinical pathology*, [en línea]. 1979, (USA), vol. 32, n°1, pp. 73-77. [Consulta: 16 junio 20015]. Disponible en:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1145571/?page=1>

**INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN. NORMA TÉCNICA ECUATORIANA NTE INEN 1105:1983.**, *Aguas. Muestreo para examen microbiológico*. Fecha de confirmación 2012-10-29., Quito-Ecuador., 2012., p. 8. [Consulta: 16 junio 20015]. Disponible en: <http://normaspdf.inen.gob.ec/pdf/nte/1105.pdf>

**INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGÍA E HIDROLOGÍA.** *Aguas termominerales en el Ecuador*. Quito-Ecuador, 2013, p. 15. [Consulta: 16 junio 20015]. Disponible en: <https://issuu.com/inamhi/docs/termalismo/3?e=0>.

**JULIO, V.** *Bacterias* [en línea]. Argentina. LIGA, 2010, pp.23-30. [Consulta: 18 abril 20015]. Disponible en: <https://biologicaliga.wordpress.com/apuntes-teoricos/>

**KONEMAN, E. et al.**, *Koneman diagnóstico microbiológico, texto y atlas en color*, [en línea]. 6ta ed., Buenos Aires-Argentina., Medica Panamericana., 2008., pp. 1693-1697.

[Consulta: 19 junio 20015]. Disponible en:

<https://books.google.com.ec/books?id=jyVQueKro88C&printsec=frontcover&dq=Koneman.+Diagnostico+Microbiologico/+Microbiological+diagnosis&hl>

**LEDESMA, R.** *Las manifestaciones termales en la superficie de la tierra* [en línea]. México. ISBN, 1988, pp. 1693-1697. [Consulta: 18 abril 20015]. Disponible en:

[http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen2/ciencia3/058/htm/sec\\_4.htm](http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen2/ciencia3/058/htm/sec_4.htm)

**MACFADDIN, J.** *Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica.*, 3ra ed., Buenos Aires-Argentina., Médica Panamericana., 2000., Pp. 73, 344, 451-673

**MENDEZ, L.** *Clasificación Bacteriana* [en línea]. Argentina. UNPA, 2012. [Consulta: 18 abril 20015]. Disponible en:

<http://gruponfermeriaunpa.blogspot.com/2012/05/clasificacion-bacteriana-lisbeth-mendez.html>

**MICROGEN BIOPRODUCTS.** *Microgen™ GN-ID Identificación* [en línea]. (2013) [Consulta: 15 marzo 20015]. Disponible en: <http://www.microgenbioproducts.com/>

**MORENO, C.et al.** “Caracterización hidrogeoquímica de las fuentes de aguas termales del estado Trujillo-Venezuela.”. *Universidad de los Andes*, vol. 6, n° 12 (2007), (Trujillo-Venezuela), pp. 92-100.

**MOSSO, M. et al.** “Microbiología del agua mineromedicinal de los Balnearios de Alhama de Granada.”. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia.*, vol. 68, n° 1 (2002), (Madrid-España), pp. 69-75.

**MOSSO, M. et al.** “Microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario Baños de la Concepción.”. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia.*, vol. 70, n° 12 (2011), (Madrid-España), pp. 57-73.

**MOSSO, M. et al.** “Microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario Valdelateja.”. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia.*, vol. 74, n° 3 (2011), (Madrid-España), pp. 285-304.

**MOSSO, M. et al.** “Microbiología de las aguas mineromedicinales de Fuente Amarga.”. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia.*, vol. 17, n° 7 (1985), (Madrid-España), Pp. 17-22

**MURRAY, P. et al.** Microbiología médica [en línea]. 5ta ed. Madrid-España. Elsevier, 2006, pp. 20-35. [Consulta: 13 abril 20015]. Disponible en:

<http://www.farmafir.onored.com/bks/Microbiologia%20Medica%20MURRAY%205%AA%20edicion%202005.pdf>

**NAPOLEON, B. et al.** *Agua termominerales en el Ecuador*, [en línea]. Quito-Ecuador, 2013. [Consulta: 22 abril 20015]. Disponible en:

<http://www.ecuadorexplorer.com/es/html/aguas-termales-y-spas.html>

**OMS.** *Food and Agriculture Organization of the United Nations Norma del Codex para las aguas minerales naturales*, [en línea]. 1998, PP. 108-119. [Consulta: 23 abril 20015]. Disponible en:

[http://www.codexalimentarius.org/input/download/report/63/cx5\\_40\\_3s.pdf](http://www.codexalimentarius.org/input/download/report/63/cx5_40_3s.pdf)

**PARRA, L. et al.** “Utilización terapéutica de las aguas y fangos mineromedicinales”. *Revista Cubana de Farmacia* [en línea]. 2002, Cuba, vol. 35, n°1, pp. 62-68. [Consulta: 23 abril 20015].

Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-75152002000100009](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152002000100009)

**PRESCOTT, L. et al.** *Microbiología* [en línea]. (5a edn). Madrid-España. International Microbiology, (2010), pp. 455-460. [Consulta: 11 marzo 20015] Disponible en:

[https://books.google.com.ec/books?id=X0GNPQAACAAJ&dq=microbiologia+de+prescott&hl=es&sa=X&redir\\_esc=y](https://books.google.com.ec/books?id=X0GNPQAACAAJ&dq=microbiologia+de+prescott&hl=es&sa=X&redir_esc=y)



## ANEXOS

### ANEXO A: Balneario Ecológico “Santa Ana”



**Foto 7:** Estrada principal Balneario “Santa Ana”. Fuente: MACAS P., 2015.



**Foto 8:** Fotografía de Piscina. Fuente: MACAS P., 2015.



**Foto 9:** Fotografía de la vertiente de agua termal. Fuente: MACAS P., 2015.



**Foto 10:** Fotografía de la vertiente de agua termal. Fuente: MACAS P., 2015.

### ANEXO B: Toma de muestras de agua



**Foto 11:** Toma de muestra en la vertiente. Fuente: MACAS P., 2015.



**Foto 12:** Toma de muestra en la piscina. Fuente: MACAS P., 2015.



## ANEXO C: Medida de parámetros físico-químicos

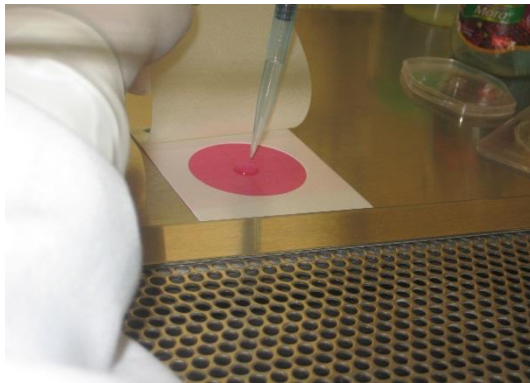


**Foto 13:** Medición de parámetros físico-químicos en la vertiente. Fuente: MACAS P., 2015



**Foto 14:** Medición de parámetros físico-químicos en la piscina. Fuente: MACAS P., 2015.

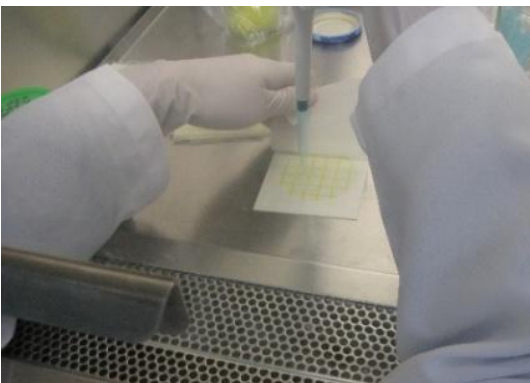
## ANEXO D: Siembra e incubación de la muestra de vertiente y piscina en placas Petrifilm



**Foto 15:** Siembra en placa Petrifilm *E. Colin*/Coliformes Totales. Fuente: MACAS P., 2015



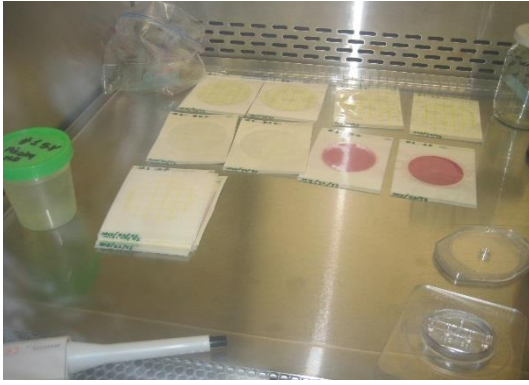
**Foto 16:** Siembra en placa Petrifilm Aerobios Totales. Fuente: MACAS P., 2015.



**Foto 17:** Siembra en placa Petrifilm Staph Express. Fuente: MACAS P., 2015.



**Foto 18:** Siembra en placa Petrifilm Mohos y Levaduras. Fuente: MACAS P., 2015.



**Foto 19:** Placas Petrifilm inoculadas. Fuente: MACAS P., 2015.

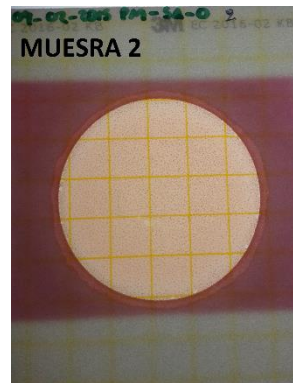


**Foto 20:** Incubación a 35°C en estufa bacteriológica. Fuente: MACAS P., 2015

**ANEXO E: Resultados del recuento de bacterias de la muestra de la vertiente de agua a las 48 horas de incubación a 35°C**



**Foto 21:** Resultado de la muestra 1 de placa *E. Coli*/Coliformes Totales. Fuente: MACAS P., 2015.



**Foto 22:** Resultado de la muestra 2 de placa *E. Coli*/Coliformes Totales. Fuente: MACAS P., 2015



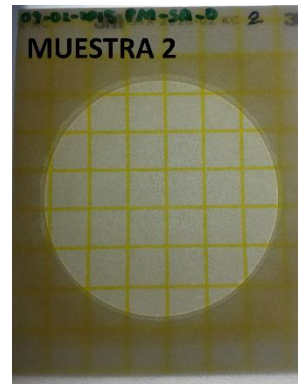
**Foto 23:** Resultados de muestra 1 de placa Aerobios Totales. Fuente: MACAS P., 2015



**Foto 24:** Resultados de muestra 2 de placa Aerobios Totales. Fuente: MACAS P., 2015



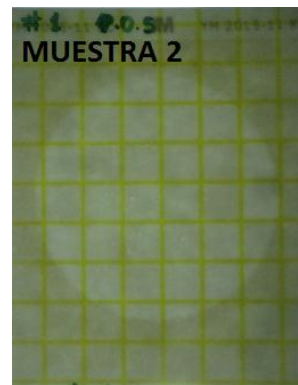
**Foto 25:** Resultados de muestra 1 de placa Staph Express. Fuente: MACAS P., 2015



**Foto 26:** Resultados de muestra 2 de placa Staph Express. Fuente: MACAS P., 2015

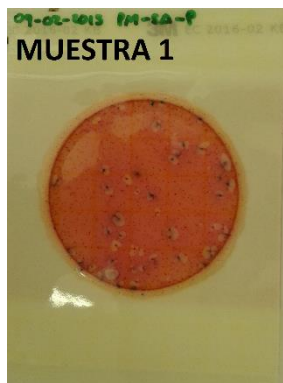


**Foto 27:** Resultados de muestra 1 de placa Mohos y Levaduras. Fuente: MACAS P., 2015



**Foto 28:** Resultados de muestra 2 de placa Mohos y Levaduras. Fuente: MACAS P., 2015

**ANEXO F: Resultados del recuento de bacterias de la muestra de la piscina tras 48 horas de incubación a 35°C**

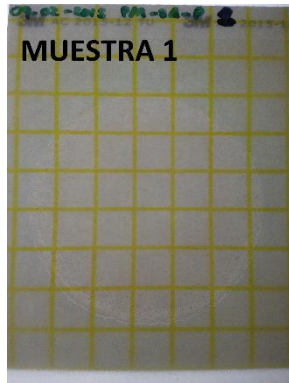


**Foto 29:** Resultado de la muestra 1 de placa *E. Coli*/Coliformes Totales. Fuente: MACAS P., 2015



**Foto 30:** Resultado de la muestra 2 de placa *E. Coli*/Coliformes Totales. Fuente: MACAS P., 2015

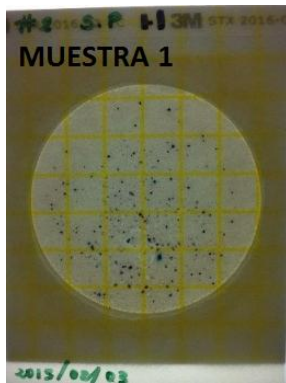




**Foto 31:** Resultados de muestra 1 de placa Aerobios Totales. Fuente: MACAS P., 2015



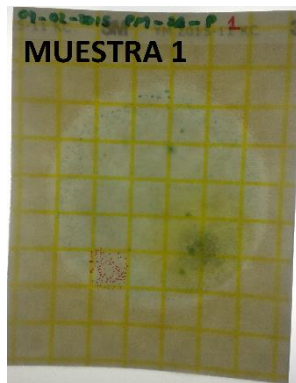
**Foto 32:** Resultados de muestra 2 de placa Aerobios Totales. Fuente: MACAS P., 2015



**Foto 33:** Resultados de muestra 1 de placa Staph Express. Fuente: MACAS P., 2015



**Foto 34:** Resultados de muestra 2 de placa Staph Express. Fuente: MACAS P., 2015

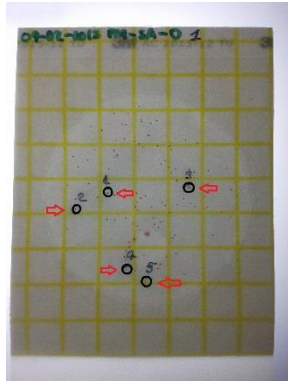


**Foto 35:** Resultados de muestra 1 de placa Mohos y Levaduras. Fuente: MACAS P., 2015



**Foto 36:** Resultados de muestra 2 de placa Mohos y Levaduras. Fuente: MACAS P., 2015

## ANEXO G: Repique y aislamiento de bacterias



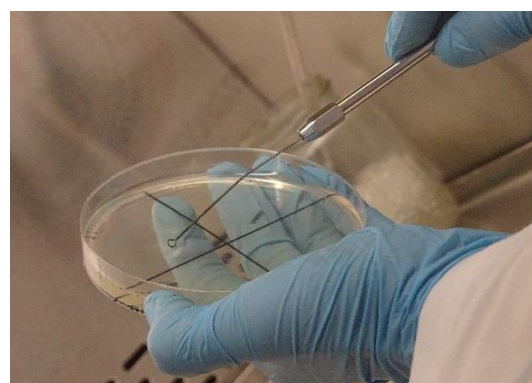
**Foto 37:** Selección de colonias. Fuente: MACAS P., 2015



**Foto 38:** Repique de colonias de la placa Petrifilm en agar Mueller Hinton. Fuente: MACAS P., 2015



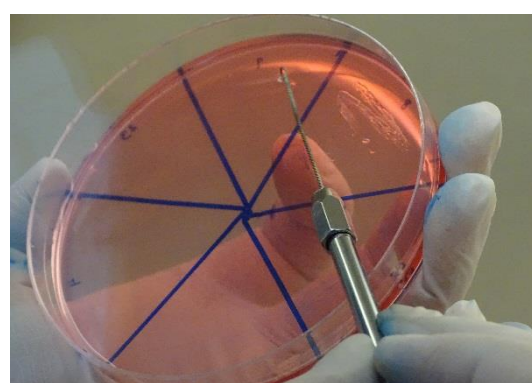
**Foto 39:** Repique en agar Mueller Hinton. Fuente: MACAS P., 2015



**Foto 40:** Siembra por estría en agar Mueller Hinton. Fuente: MACAS P., 2015



**Foto 41:** Siembra por estría en agar Eosina Azul de Metileno. Fuente: MACAS P., 2015



**Foto 42:** Siembra por estría en agar MacConkey. Fuente: MACAS P., 2015



**ANEXO H: Resultado de los repiques de las bacterias dela muestra de la vertiente**



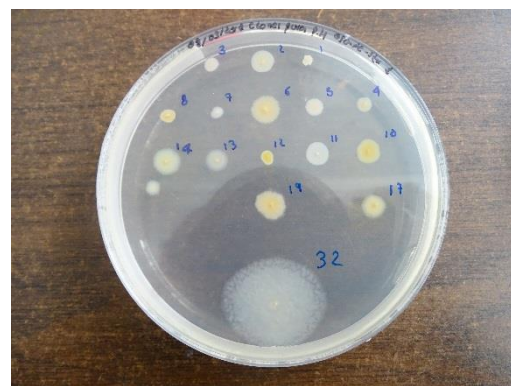
**Foto 43:** Repique 1. Fuente: MACAS P., 2015



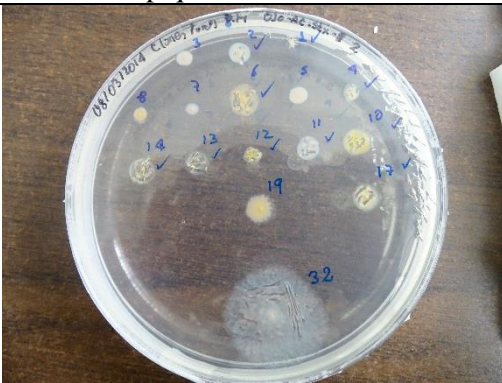
**Foto 44:** Repique 2. Fuente: MACAS P., 2015



**Foto 45:** Repique 3. Fuente: MACAS P., 2015



**Foto 46:** Repique 4. Fuente: MACAS P., 2015



**Foto 47:** Repique 5. Fuente: MACAS P., 2015



**Foto 48:** Repique 6. Fuente: MACAS P., 2015

**ANEXO I: Resultado de los repiques de las bacterias de la muestra de la piscina**



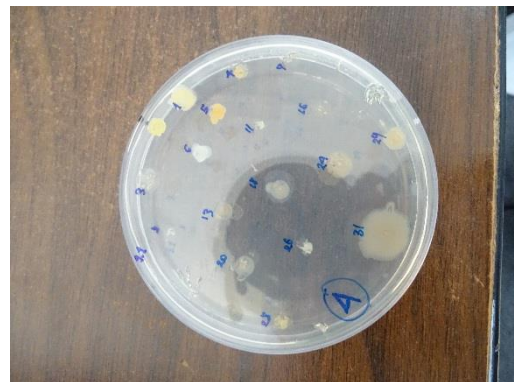
**Foto 49:** Repique 1. Fuente: MACAS P., 2015



**Foto 50:** Repique 2. Fuente: MACAS P., 2015



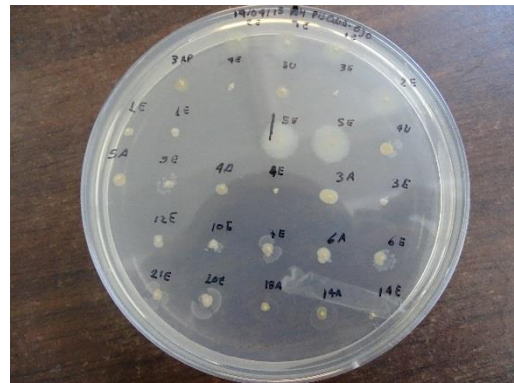
**Foto 51:** Repique 3. Fuente: MACAS P., 2015



**Foto 52:** Repique 4. Fuente: MACAS P., 2015



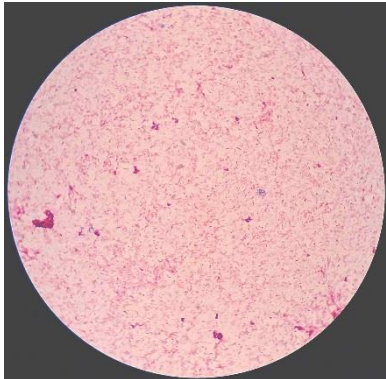
**Foto 53:** Repique 5. Fuente: MACAS P., 2015



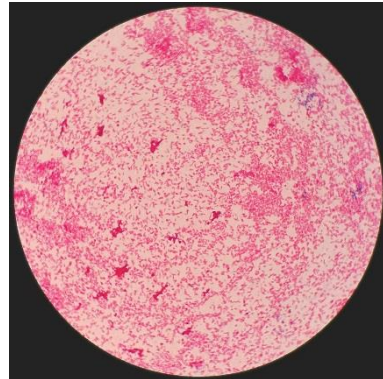
**Foto 54:** Repique 6. Fuente: MACAS P., 2015



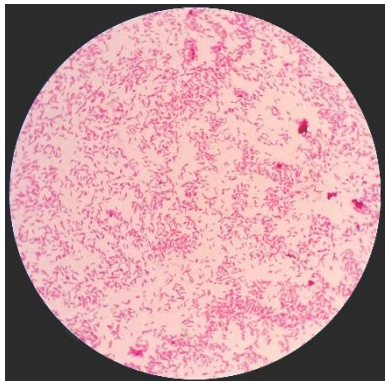
**ANEXO J: Resultado de la tinción Gram de las bacterias aisladas de la muestra de la vertiente**



**Foto 55:** Tinción Gram de la colonia MV1-1.  
Fuente: MACAS P., 2015



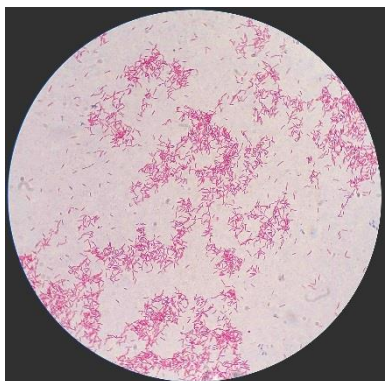
**Foto 56:** Tinción Gram de la colonia MV1-2.  
Fuente: MACAS P., 201



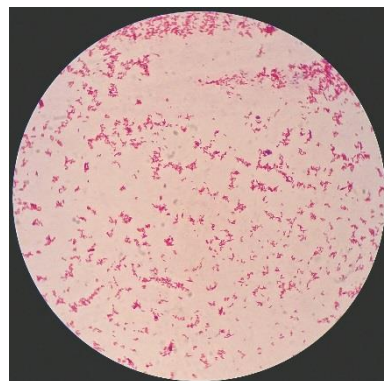
**Foto 57:** Tinción Gram de la colonia MV1-3.  
Fuente: MACAS P., 2015



**Foto 58:** Tinción Gram de la colonia MV2-4.  
Fuente: MACAS P., 2015



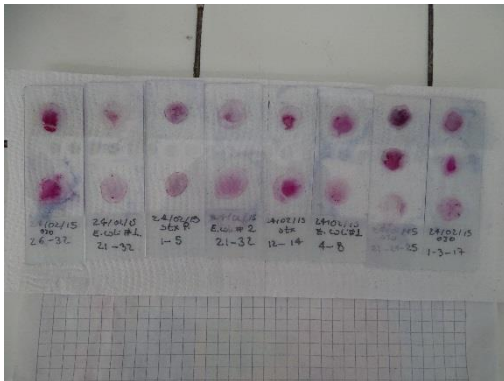
**Foto 59:** Tinción Gram de la colonia MV2-5.  
Fuente: MACAS P., 2015



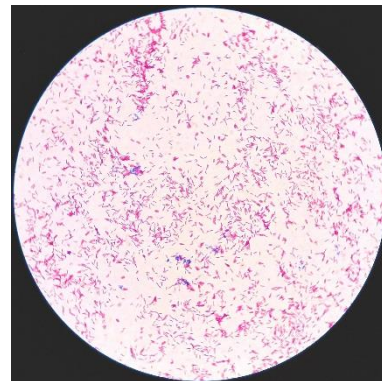
**Foto 60:** Tinción Gram de la colonia MV2-6.  
Fuente: MACAS P., 2015



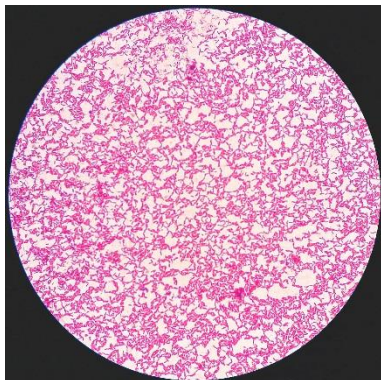
**ANEXO K: Resultado de la tinción Gram de las bacterias aisladas de la muestra de la piscina**



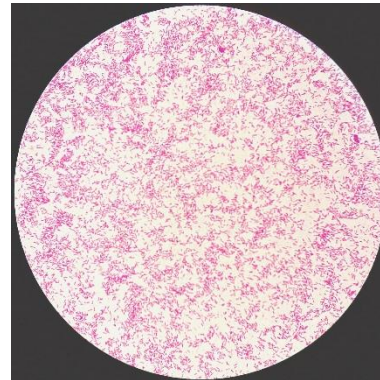
**Foto 61:** Tinción Gram de colonias aisladas de la piscina. Fuente: MACAS P., 2015



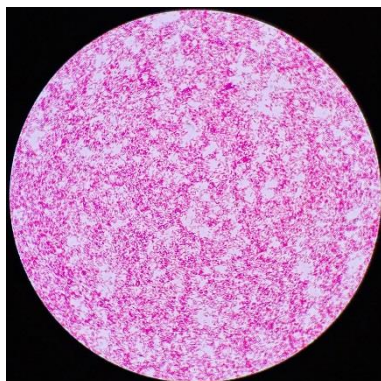
**Foto 62:** Tinción Gram de la colonia MP1-7. Fuente: MACAS P., 2015



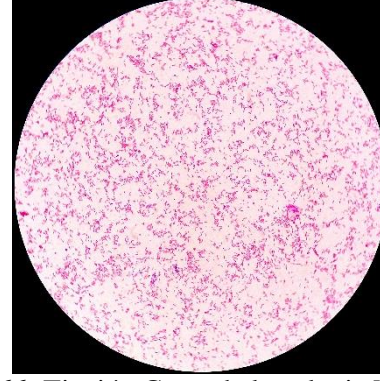
**Foto 63:** Tinción Gram de la colonia MP1-8. Fuente: MACAS P., 2015



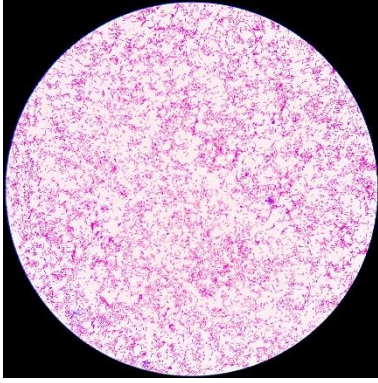
**Foto 64:** Tinción Gram de la colonia MP1-9. Fuente: MACAS P., 2015



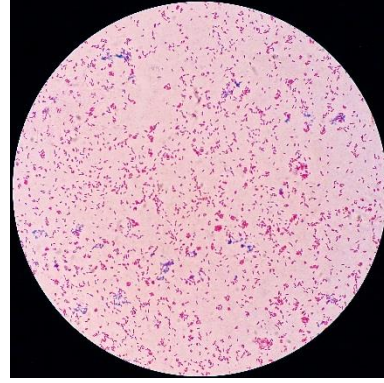
**Foto 65:** Tinción Gram de la colonia MP1-10. Fuente: MACAS P., 2015



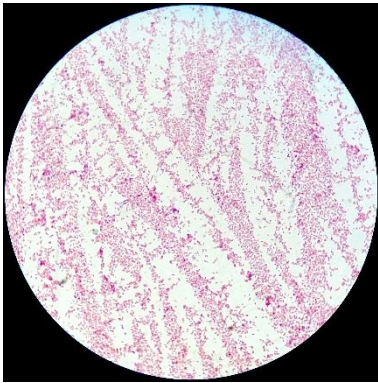
**Foto 66:** Tinción Gram de la colonia MP2-11. Fuente: MACAS P., 2015



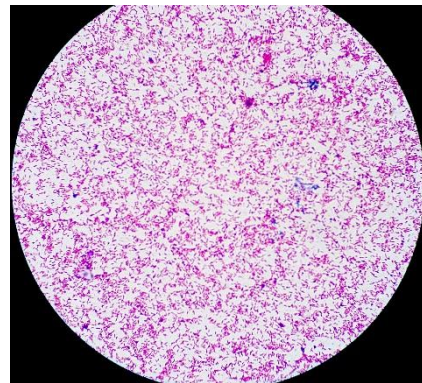
**Foto 67:** Tinción Gram de la colonia MP2-12. Fuente: MACAS P., 2015



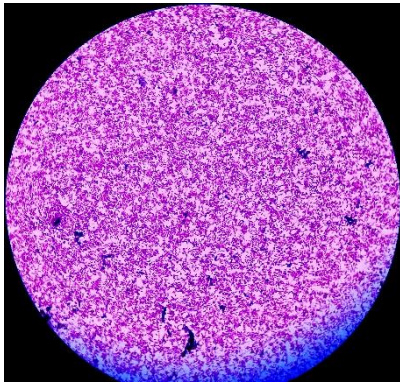
**Foto 68:** Tinción Gram de la colonia MP2-13. Fuente: MACAS P., 2015



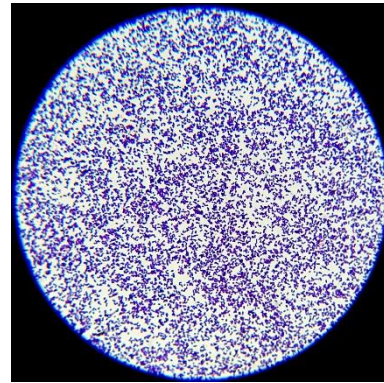
**Foto 69:** Tinción Gram de la colonia MP2-14. Fuente: MACAS P., 2015



**Foto 69:** Tinción Gram de la colonia MP2-14. Fuente: MACAS P., 2015



**Foto 71:** Tinción Gram de la colonia MP2-16. Fuente: MACAS P., 2015



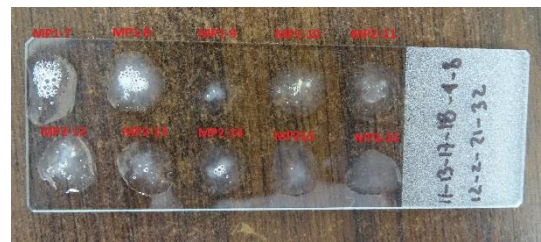
**Foto 72:** Tinción Gram de la colonia MP2-17. Fuente: MACAS P., 2015



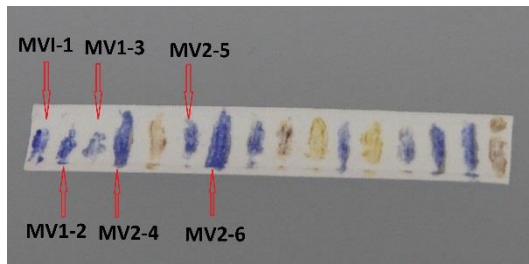
**ANEXO L: Resultados de la prueba de catalasa y oxidasa de las colonias aisladas de vertiente y piscina**



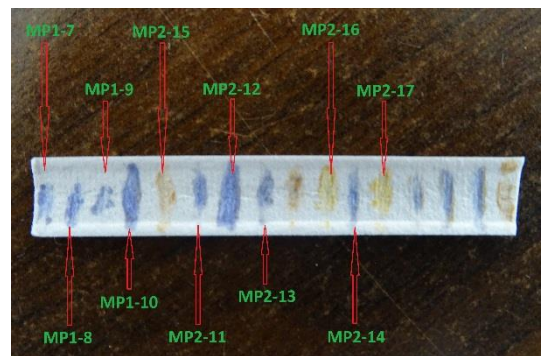
**Foto 73:** Toma de una porción de la colonia.  
Fuente: MACAS P., 2015



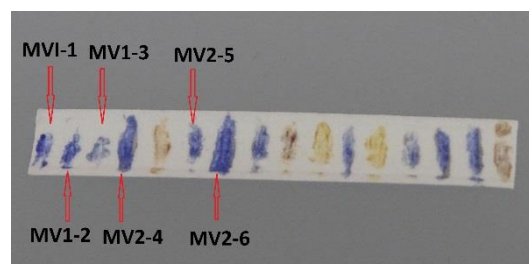
**Foto 74:** Adición de peróxido de hidrógeno.  
Fuente: MACAS P., 2015



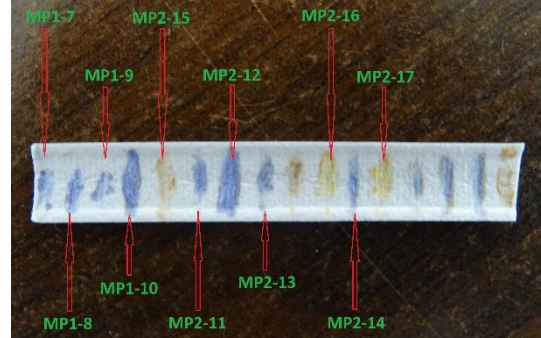
**Foto 75:** Resultado prueba de catalasa de las colonias aisladas de la vertiente. Fuente: MACAS P., 2015



**Foto 76:** Resultado prueba de catalasa de las colonias aisladas de la piscina. Fuente: MACAS P., 2015



**Foto 77:** Resultado prueba de oxidasa de las colonias aisladas de la vertiente. Fuente: MACAS P., 2015

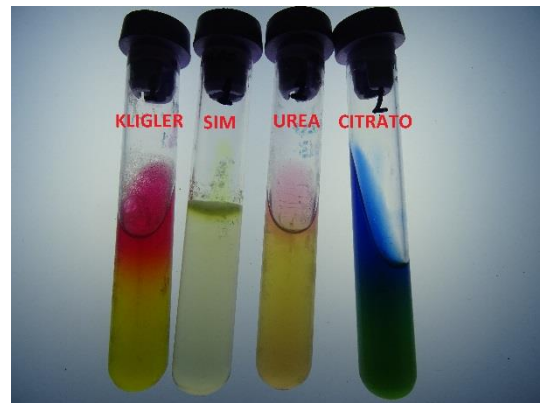


**Foto 78:** Resultado prueba de oxidasa de las colonias aisladas de la piscina. Fuente: MACAS P., 2015

**ANEXO M: Resultados de las pruebas bioquímicas de las colonias aisladas de la muestra de la vertiente**



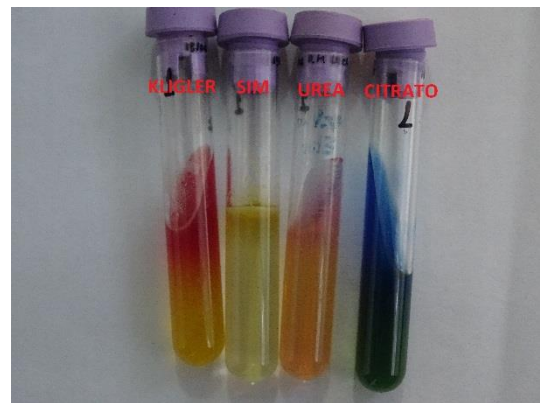
**Foto 79:** Prueba de oxidación/fermentación.  
Fuente: MACAS P., 2015



**Foto 80:** Prueba de Kligler, Indol, motilidad, urea y citrato de la colonia MV1-1. Fuente: MACAS P., 2015



**Foto 81:** Prueba de Kligler, Indol, motilidad, urea y citrato de la colonia MV1-2. Fuente: MACAS P., 2015



**Foto 82:** Prueba de Kligler, Indol, motilidad, urea y citrato de la colonia MV1-3. Fuente: MACAS P., 2015

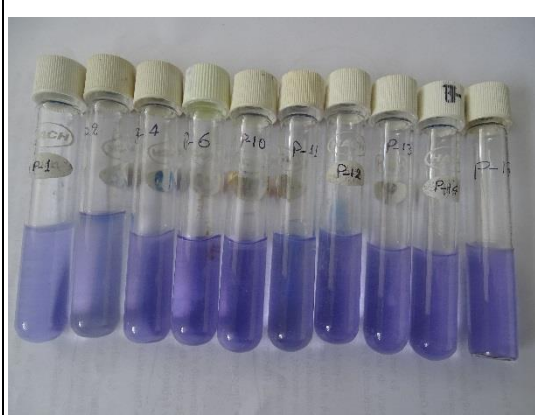


**Foto 83:** Prueba de Kligler, Indol, motilidad, urea y citrato de la colonia MV2-5. Fuente: MACAS P., 2015



**Foto 84:** Prueba de Kligler, Indol, motilidad, urea y citrato de la colonia MV2-6. Fuente: MACAS P., 2015

**ANEXO N: Resultados de la pruebas bioquímicas de las colonias aisladas de la muestra de la piscina**



**Foto 85:** Prueba de oxidación/fermentación.  
Fuente: MACAS P., 2015



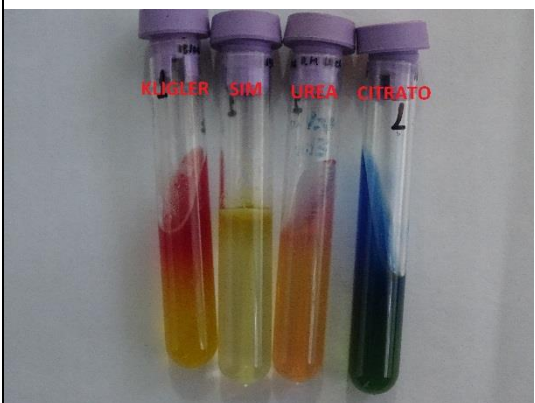
**Foto 86:** Prueba de Kligler, Indol, motilidad, urea y citrato de la colonia MP1-7. Fuente: MACAS P., 2015



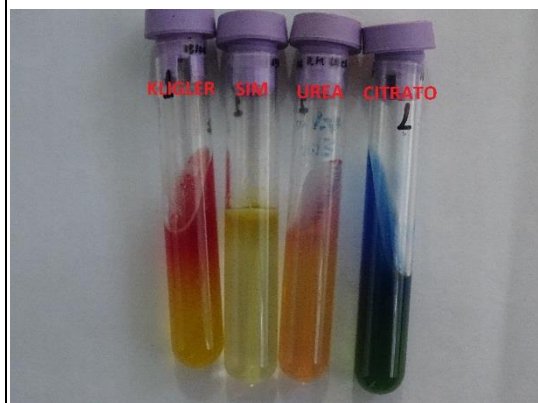
**Foto 87:** Prueba de Kligler, Indol, motilidad, urea y citrato de la colonia MP1-8. Fuente: MACAS P., 2015



**Foto 88:** Prueba de Kligler, Indol, motilidad, urea y citrato de la colonia MP1-9. Fuente: MACAS P., 2015



**Foto 89:** Prueba de Kligler, Indol, motilidad, urea y citrato de la colonia MP1-10. Fuente: MACAS P., 2015

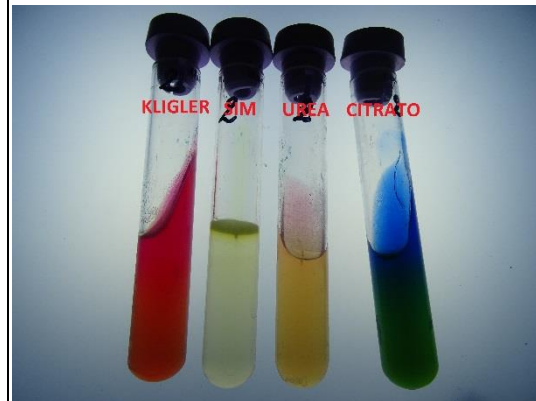


**Foto 90:** Prueba de Kligler, Indol, motilidad, urea y citrato de la colonia MP2-11. Fuente: MACAS P., 2015





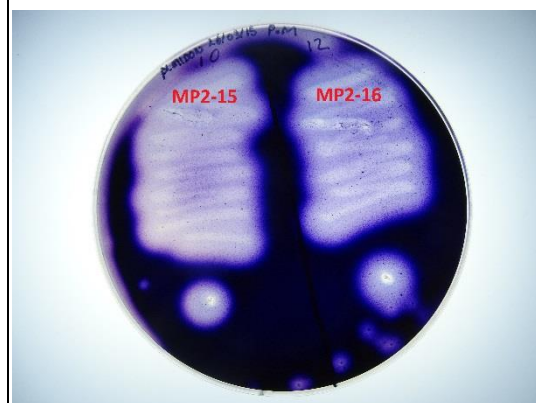
**Foto 91:** Prueba de Kligler, Indol, motilidad, urea y citrato de la colonia MP2-12. Fuente: MACAS P., 2015



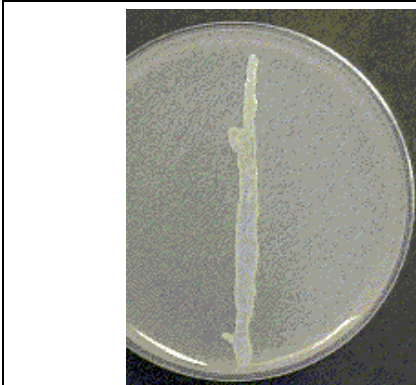
**Foto 92:** Prueba de Kligler, Indol, motilidad, urea y citrato de la colonia MP2-13. Fuente: MACAS P., 2015



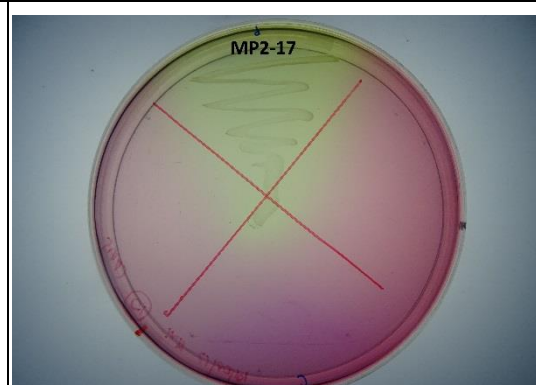
**Foto 93:** Prueba de Kligler, Indol, motilidad, urea y citrato de la colonia MP2-14. Fuente: MACAS P., 2015



**Foto 94:** Prueba de hidrólisis del almidón de la colonia MP2-15 y MP2-16. Fuente: MACAS P., 2015

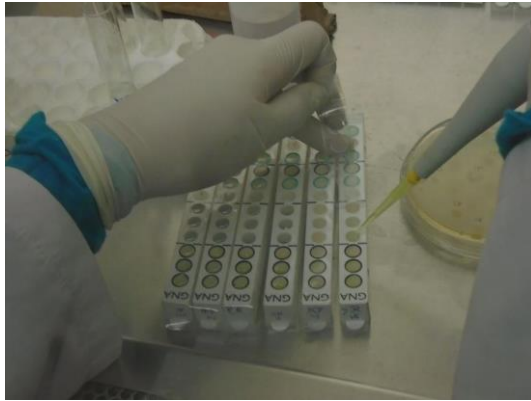


**Foto 95:** Prueba de hidrólisis de la gelatina de la colonia MP2-15. Fuente: MACAS P., 2015



**Foto 96:** Prueba de Manitol Salado de la colonia MP2-17. Fuente: MACAS P., 2015

**ANEXO O: Resultados del análisis de la colonia MV2-4 en el sistema de identificación de bacterias Microgen™GnA+B-ID System**



**Foto 97:** Siembra de la muestra. Fuente: MACAS P., 2015



**Foto 98:** Cubrir la tira con cinta adhesiva. Fuente: MACAS P., 2015



**Foto 99:** Incubación a 35°C. Fuente: MACAS P., 2015



**Foto 100:** Resultados tira GN A. Fuente: MACAS P., 2015



**Foto 101:** Resultados tira GN B. Fuente: MACAS P., 2015

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

Lab. No. \_\_\_\_\_ Specimen Type: \_\_\_\_\_  
 Date: 14/02/2015

Well Number	GN A wells												GN B wells														
	Oxidase	Methyl	Nitrate	Lysine	Ornithine	HES	Glucose	Mannitol	Xylose	ONPG	Urease	VP	Citrate	TDA	Gelatin	Mucinase	Inositol	Sorbitol	Starch	Sucrose	Lecanase	Ambrosine	Adonitol	Raffinose	Sialin	Arginine	
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
19	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
21	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
22	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
23	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
24	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
26	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
27	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
28	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
29	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
30	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
31	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
32	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
33	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
34	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

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

WFE:250603

**Foto 102:** Hoja de resultados. Fuente: MACAS P., 2015

**Microgen GNA + B Oxidase Positive**

**Specimen Details**

Lab Ref.: P-1-O  
 Name: PATRICIA MAQCAS  
 Specimen Type:  
 Source (ward/location):

Date:

**Results Entry**

Octal Code: 750014001

+ 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 Decaminase
+ 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>S.putrefaciens</i>	<i>Ps.stutzeri</i>	<i>A.xylosoxidans</i>	<i>Px.aeruginosa</i>	<i>V.alginolyticus</i>
Probability	1/49,815,017	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000
Percent Probability	99.17%	0.76%	0.03%	0.03%	<0.01%
Likelihood	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%
Human Isolate	No	Yes	Yes	Yes	Yes
<b>Tests against</b>					
Test 1	TDA (0.1%)	H2S (0.1%)	H2S (0.1%)	H2S (0.1%)	H2S (0.1%)
Test 2	ARG (0.1%)	TDA (0.1%)	TDA (0.1%)	TDA (0.1%)	TDA (0.1%)
Test 3	ORN (80%)	GFL (3%)	ARG (0.1%)	CIT (95%)	ARG (0.1%)
Additional Tests	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Oxidation of Glucose	0.1%	99.9%	0.1%	99.9%	0.1%
Ferment of Glucose	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	99.9%
Growth on Cetrimide	0.1%	0.1%	23%	94%	0%
Growth on SS Agar	46%	54%	98%	96%	77%
Growth at 42C	30%	69%	84%	99.9%	27%
Additional Comments	6		1		
1	Previously Alcaligenes xylosoxidans. Microbiol Immunol (1998) 42: 429 - 438				
6	Previously A/Ps.putrefaciens				

**Identification Comments**

Acceptable Identification of *Shewanella putrefaciens*  
 The strain is not typical (multiple tests are against), although it is highly separated from other suggested identification choices  
 ADDITIONAL TESTS MAY IMPROVE THE IDENTIFICATION.

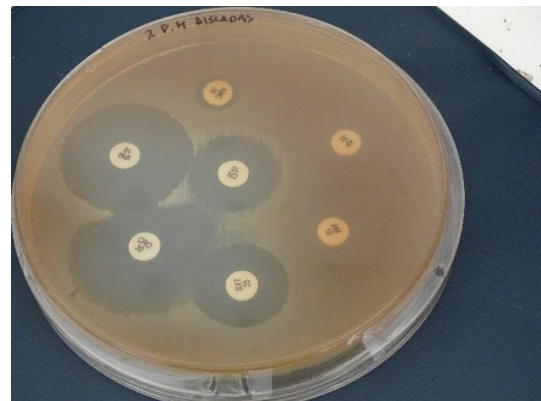
**Foto 103:** Resultado del perfil numérico del software Microgen Identification System (MID-60). Fuente: MACAS P., 2015



**ANEXO P: Antibiograma**



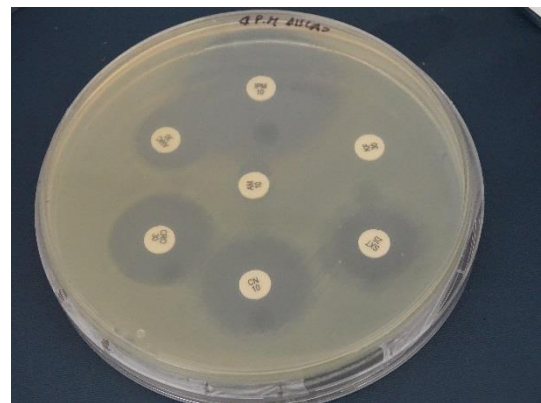
**Foto 104:** Antibiograma de la cepa MV1-1.  
Fuente: MACAS P., 2015



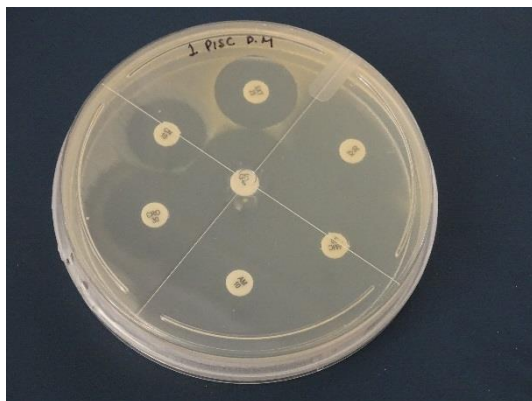
**Foto 105:** Antibiograma de la cepa MV1-2.  
Fuente: MACAS P., 2015



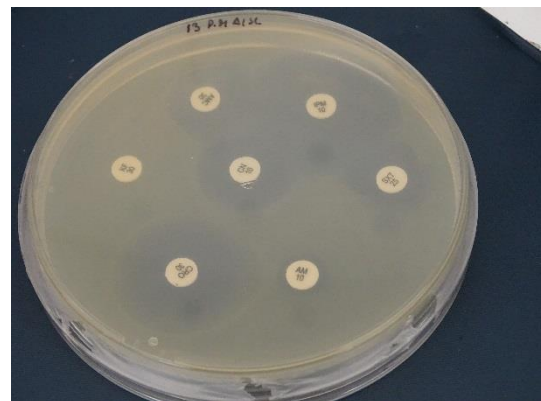
**Foto 106:** Antibiograma de la cepa MV1-3.  
Fuente: MACAS P., 2015



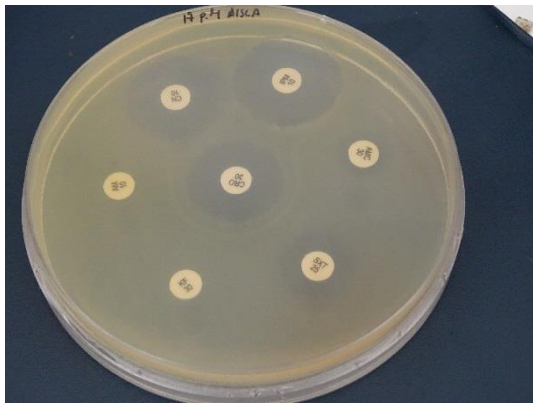
**Foto 107:** Antibiograma de la cepa MV2-6.  
Fuente: MACAS P., 2015



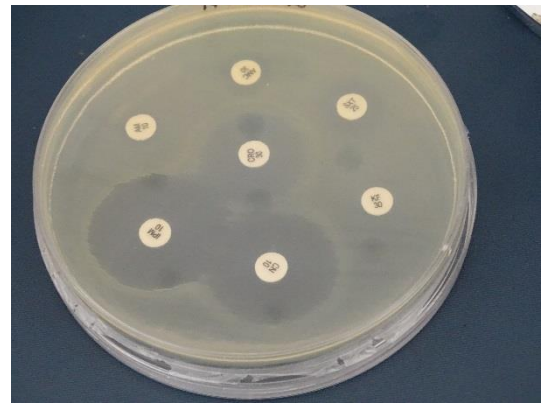
**Foto 108:** Antibiograma de la cepa MP1-7.  
Fuente: MACAS P., 2015



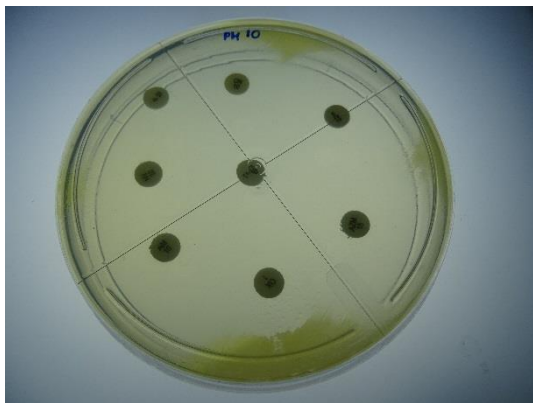
**Foto 109:** Antibiograma de la cepa MP2-11.  
Fuente: MACAS P., 2015



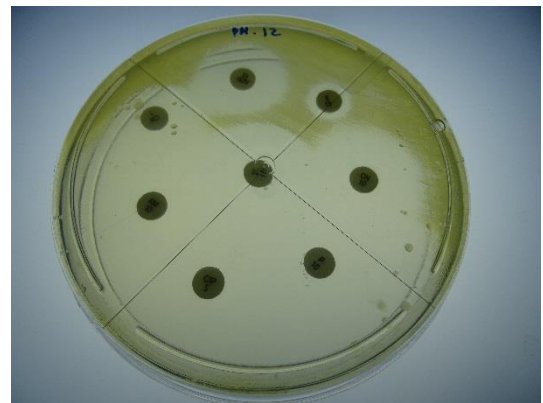
**Foto 110:** Antibiograma de la cepa MP2-12.  
Fuente: MACAS P., 2015



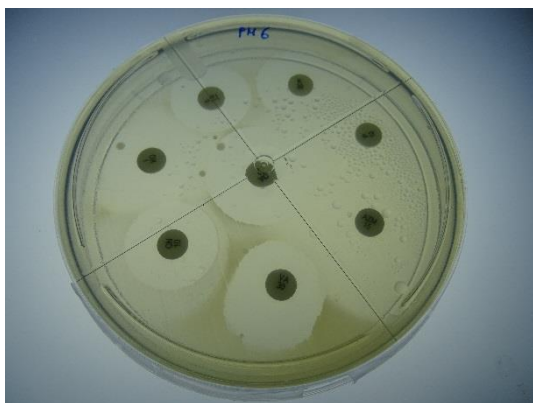
**Foto 111:** Antibiograma de la cepa MP2-13.  
Fuente: MACAS P., 2015



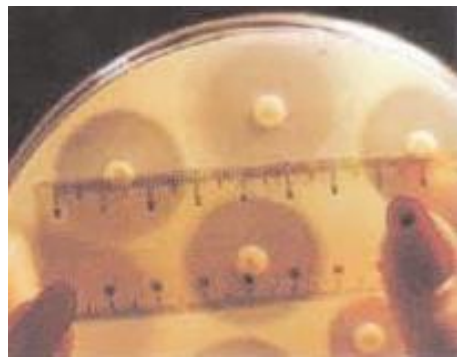
**Foto 112:** Antibiograma de la cepa MP2-15.  
Fuente: MACAS P., 2015



**Foto 113:** Antibiograma de la cepa MP2-16.  
Fuente: MACAS P., 2015



**Foto 114:** Antibiograma de la cepa MP2-17.  
Fuente: MACAS P., 2015



**Foto 115:** Medición de los halos de sensibilidad. Fuente: MACAS P., 2015

