



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

**“ESTUDIO MICROBIOLÓGICO DEL MANANTIAL TERMAL
DEL BALNEARIO RUMILOMA DE LA PARROQUIA
GUANGOPOLO PERTENECIENTE A LA PROVINCIA DE
PICHINCHA”**

Trabajo de titulación presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

AUTORA: KATY ELIZABETH JACHO ORTIZ

TUTOR: Dr. GERARDO EMILIO MEDINA RAMÍREZ

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 DEL MANANTIAL TERMAL DEL BALNEARIO RUMILOMA DE LA PARROQUIA GUANGOPOLO PERTENECIENTE A LA PROVINCIA DE PICHINCHA”**, de responsabilidad de la señorita Katy Elizabeth Jacho Ortiz, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Titulación, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Dr. Gerardo Medina
**DIRECTOR DEL TABAJO
DE TITULACIÓN**

Dr. Félix Andueza
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

**DOCUMENTALISTA
SISBIB ESPOCH**

NOTA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Katy Elizabeth Jacho Ortiz, 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.

KATY ELIZABETH JACHO ORTIZ

DEDICATORIA

A Dios por colmarme de muchas bendiciones y nunca dejarme sola.

A mis padres por ser el motor fundamental en mi vida, por su apoyo, amor y dedicación incondicional, por brindarme su confianza, por esas palabras de aliento en los momentos difíciles y estar presente siempre en cada etapa de mi vida.

A mi hermano y a toda mi familia en general por estar presentes siempre y nunca dejarme sola, quienes me inspiran a ser una mejor persona y a seguir superándome cada día.

A todos ustedes les dedico este trabajo de investigación con todo mi amor y cariño.

Katy

AGRADECIMIENTO

A Dios por bendecirme y ponerme en mi vida a grandes personas que me inspiran a ser cada día mejor.

A mis padres por ser el motor de mi vida, por su infinito amor, apoyo y confianza.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Escuela de Bioquímica y Farmacia por su acogida y conocimientos brindados.

Al Dr. Gerardo Medina por su gran ayuda incondicional, conocimiento y experiencia en el asesoramiento de la presente Tesis.

Al Dr. Félix Andueza Colaborador de Tesis por el aporte brindado en el desarrollo de esta investigación.

A las Doctoras Aída, Patricia e Isabel así también al Sr. Eduardo y Vinicio por su ayuda prestada.

A mis amigos por su amistad y apoyo durante el curso de esta formación académica.

A todas las personas que colaboraron de una u otra manera para la culminación de esta investigación.

Gracias.

Katy

CONTENIDO

CONTENIDO	Páginas
RESUMEN.....	xviii
SUMARY.....	xix
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I	
1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL.....	3
1.1 Aguas Termales.....	3
1.1.1 Origen de las aguas termales.....	3
1.1.2 Características físicas de las aguas termales.....	3
1.1.3 Clasificación de las aguas termales.....	4
1.1.3.1 De acuerdo a su Temperatura.....	4
1.1.3.2 De acuerdo a su Composición Química.....	4
1.1.3.3 De acuerdo a la Cantidad de Residuos Secos.....	5
1.1.4 Beneficios de aguas termales.....	5
1.2 Control de Calidad de Aguas Minero-Medicinales.....	5
1.2.1 Caudal.....	6
1.2.2 Temperatura.....	6
1.2.3 Radiactividad.....	6
1.3 Agua Termal de Rumiloma de la Parroquia Guangopolo.....	6
1.3.1 Parroquia Guangopolo.....	6
1.3.2 Agua termal del Balneario Rumiloma.....	7
1.4 Microbiología.....	8
1.4.1 Análisis Microbiológico.....	9
1.4.1.1 Microorganismos Totales y Vivos.....	9
1.4.1.2 Microorganismos Indicadores.....	9
1.4.1.2.1 Bacterias Aerobias Mesófilas.....	9
1.4.1.2.2 Coliformes Totales.....	9
1.4.1.2.3 Coliformes Fecales.....	9
1.4.1.2.4 Mohos y Levaduras.....	10
1.5 Microorganismos Presentes en Aguas Termales.....	10
1.5.1 Brevundimonas diminuta.....	10
1.5.2 Xenorhabdus beddingii.....	10

1.5.3	<i>Budvicia aquatica</i>	11
1.5.4	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	11
1.5.5	<i>Bacillus mycoides</i>	12
1.5.6	Género <i>Staphylococcus</i>	12
1.6	Cultivo de Microorganismos	13
1.6.1	<i>Medios de Cultivo</i>	13
1.6.1.1	<i>Condiciones generales para el cultivo de microorganismos</i>	13
1.6.1.2	<i>Clasificación de medios de cultivo</i>	14
1.7	Identificación de Microorganismos	15
1.7.1	<i>Morfología Bacteriana</i>	15
1.7.1.1	<i>Características macroscópicas de las bacterias</i>	15
1.7.1.2	<i>Características microscópicas de las bacterias</i>	16
1.7.1.2.1	<i>Tinción Gram</i>	16
1.7.2	<i>Placas Petrifilm</i>	17
1.8	Pruebas Bioquímicas	18
1.8.1	<i>Oxidasa</i>	18
1.8.2	<i>Catalasa</i>	18
1.8.3	<i>Oxidación- Fermentación (OF)</i>	19
1.8.4	<i>Agar Hierro de Kligler (KIA)</i>	20
1.8.5	<i>SIM (Sulfhídrico Indol Movilidad)</i>	20
1.8.6	<i>Citrato</i>	22
1.8.7	<i>Reacción de la Ureasa</i>	22
1.8.8	<i>Hidrólisis de Almidón</i>	23
1.8.9	<i>Hidrólisis de Gelatina</i>	24
1.9	Sistema Multipruebas (MICROGEN™ GN-ID)	24
1.10	Pruebas de sensibilidad antimicrobiana	25
1.10.1	<i>Antibiograma</i>	25
1.10.1.1	<i>Difusión con disco</i>	25

CAPÍTULO II

2.	MARCO METODOLÓGICO	27
2.1	Lugar de Investigación	27
2.2	Unidad de Análisis	27
2.3	Factores de Estudio	27
2.4	Tamaño de Muestra	27
2.5	Materiales, Equipos, Reactivos	28

2.5.1	<i>Materias Primas y/o Muestras</i>	28
2.5.2	<i>Materiales</i>	28
2.5.3	<i>Equipos</i>	28
2.5.4	<i>Reactivos</i>	29
2.6	Métodos y Técnicas	29
2.6.1	<i>Muestreo</i>	29
2.6.2	<i>Análisis Físico-Químico</i>	30
2.6.3	<i>Análisis Microbiológico</i>	30
2.6.3.1	<i>Recuento de bacterias aerobias mesófilas, coliformes totales y fecales, Staphylococcus aureus, mohos y levaduras por el método de placas con película secas rehidratables petrifilm</i>	30
2.6.3.2	<i>Descripción macroscópica de las colonias</i>	30
2.6.3.3	<i>Estabilización del aislado bacteriano</i>	31
2.6.3.4	<i>Tinción Gram del aislado bacteriano puro</i>	31
2.6.4	Pruebas Bioquímicas del aislado bacteriano puro	31
2.6.4.1	<i>Oxidasa</i>	31
2.6.4.2	<i>Catalasa</i>	32
2.6.4.3	<i>Oxidación –Fermentación (OF)</i>	32
2.6.4.4	<i>Kligler</i>	32
2.6.4.5	<i>SIM (Sulphídrico Indol Movilidad)</i>	32
2.6.4.6	<i>Citrato</i>	33
2.6.4.7	<i>Reacción de la Ureasa</i>	33
2.6.4.8	<i>Hidrólisis de Almidón</i>	33
2.6.4.9	<i>Hidrólisis de Gelatina</i>	33
2.6.4.10	<i>Esquemas del Estudio Microbiológico con cada una de las Identificaciones de las Bacterias encontradas en el Balneario Rumiloma</i>	34
2.6.5	Identificación de colonias bacterianas puras por galerías MICROGENTM GN-ID	40
2.6.6	Prueba de sensibilidad antimicrobiana	40
2.6.7	Prueba fenotípica para la determinación de Metalo β-Lactamasas	41
 CAPÍTULO III		
3.	MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	42
3.1	Parámetros In Situ	42
3.2	Recuento de bacterias Aerobias Mesófilas	44

3.3	Recuento de bacterias de Coliformes Totales y Fecales.....	46
3.4	Recuento de Staph Express (<i>Staphylococcus aureus</i>).....	48
3.5	Recuento de Mohos y Levaduras.....	50
3.6	Número de Clones Aislados.....	52
3.7	Número y Tipos de Cepas Aisladas Seleccionadas.....	54
3.8	Identificación de Bacterias Gram Negativas.....	56
3.9	Identificación de Bacterias Gram Positivas.....	59
3.10	Especies de Bacterias Identificadas.....	61
3.11	Antibiograma de Bacilos Gram Negativos.....	65
3.12	Antibiograma de Bacilos y Cocos Gram Positivos.....	67
3.13	Presencia fenotípica de Metalo β-Lactamasas.....	68
	CONCLUSIONES.....	69
	RECOMENDACIONES.....	70
	BIBLIOGRAFÍA	
	ANEXOS	

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

KIA	Agar Hierro de Kligler
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
°C	Grados Celsius
INAMHI	Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología
m.s.n.m	Metros sobre el nivel del mar
µg ó mcg	Microgramos
µg/mL	Microgramos por mililitro
µL	Microlitro
µm	Micrómetro
µs/cm	Microsiemens por centímetro
mg/L	Miligramo por litro
mg/mL	Miligramo por mililitro
mm	Milímetro
%	Porcentaje
pH	Potencial de hidrógeno
STD	Sólidos Totales Disueltos
SIM	Sulfhídrico Indol Movilidad
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colonias por mililitro

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1-1.	Clasificación de las aguas termales de acuerdo a su composición química.....	4
Cuadro 2-1.	Clasificación de los medios de cultivo según su utilización.....	14
Cuadro 3-1.	Características morfológicas de las bacterias.....	15

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1.	Ubicación de la parroquia Guangopolo.....	7
Figura 2-1.	Ubicación del Balneario Rumiloma.....	8
Figura 3-1.	<i>Brevundimonas diminuta</i>	10
Figura 4-1.	<i>Xenorhabdus beddingii</i>	11
Figura 5-1.	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	12
Figura 6-1.	<i>Bacillus mycoides</i>	12
Figura 7-1.	<i>Staphylococcus aureus</i>	13
Figura 8-1.	Tinción Gram.....	17
Figura 9-1.	Placas Petrifilm.....	17
Figura 10-1.	Prueba Oxidasa.....	18
Figura 11-1.	Prueba Catalasa.....	19
Figura 12-1.	Prueba Oxido-Fermentación (OF).....	19
Figura 13-1.	Prueba Kligler.....	20
Figura 14-1.	Prueba SIM (Producción de H ₂ S).....	21
Figura 15-1.	Prueba SIM (Indol).....	21
Figura 16-1.	Prueba SIM (Movilidad).....	22
Figura 17-1.	Prueba Citrato.....	22
Figura 18-1.	Prueba Ureasa.....	23
Figura 19-1.	Hidrólisis de Almidón.....	23
Figura 20-1.	Hidrólisis de Gelatina.....	24
Figura 21-1.	Galerías Microgen TM	25
Figura 22-1.	Antibiograma por difusión de disco.....	26
Figura 23-2.	Esquema General del Análisis Microbiológico.....	34
Figura 24-2.	Esquema General de Identificación de Bacterias Aisladas en el ojo de agua.....	35
Figura 25-2.	Esquema General de Identificación de Bacterias Aisladas en el chorro de agua.....	36
Figura 26-2.	Esquema de Identificación de <i>Xenorhabdus beddingii</i>	37
Figura 27-2.	Esquema de Identificación de <i>Budvicia aquatica</i>	37
Figura 28-2.	Esquema de Identificación de <i>Pseudomonas stutzeri</i>	38
Figura 29-2.	Esquema de Identificación de <i>Staphylococcus spp</i>	38
Figura 30-2.	Esquema de Identificación de <i>Bacillus mycoides</i>	39
Figura 31-2.	Esquema de Identificación de <i>Brevundimonas diminuta</i>	39

Figura 32-2.	Esquema de Identificación de <i>Bacillus spp</i>	40
---------------------	--	----

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-3.	Recuento de bacterias Aerobias Mesófilas (UFC/mL) del Manantial Termal del Balneario “Rumiloma”.....	45
Gráfico 2-3.	Recuento de bacterias de Coliformes Totales y Fecales (UFC/mL) del Manantial Termal del Balneario “Rumiloma”.....	47
Gráfico 3-3.	Recuento de bacterias del género <i>Staphylococcus</i> (UFC/mL) del Manantial Termal del Balneario “Rumiloma”.....	49
Gráfico 4-3.	Recuento de Mohos y Levaduras (UFC/mL) del Manantial Termal del Balneario “Rumiloma”.....	51
Gráfico 5-3.	Porcentaje de clones aislados del Manantial Termal del Balneario “Rumiloma”.....	53
Gráfico 6-3.	Porcentaje de cepas aisladas seleccionadas del Manantial Termal del Balneario “Rumiloma”.....	54
Gráfico 7-3.	Porcentaje de especies de bacterias identificadas del Manantial Termal del Balneario “Rumiloma”.....	62

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1.	Clasificación de las aguas termales de acuerdo a la temperatura.....	4
Tabla 2-1.	Clasificación de las aguas termales de acuerdo a la cantidad de residuos secos.....	5
Tabla 3-3.	Determinación de parámetros in situ del Manantial Termal del Balneario “Rumiloma”.....	42
Tabla 4-3.	Recuento de bacterias Aerobias Mesófilas (UFC/mL) del Manantial Termal del Balneario “Rumiloma”.....	44
Tabla 5-3.	Recuento de bacterias de Coliformes Totales y Fecales (UFC/mL) del Manantial Termal del Balneario “Rumiloma”.....	46
Tabla 6-3.	Recuento de bacterias del género <i>Staphylococcus</i> (UFC/mL) del Manantial Termal del Balneario “Rumiloma”.....	48
Tabla 7-3.	Recuento de Mohos y Levaduras (UFC/mL) del Manantial Termal del Balneario “Rumiloma”.....	50
Tabla 8-3.	Número de clones aislados del Manantial Termal del Balneario “Rumiloma”.....	52
Tabla 9-3.	Número y Tipos de cepas aisladas seleccionadas del Manantial Termal del Balneario “Rumiloma”.....	54
Tabla 10-3.	Origen, Morfología y Pruebas bioquímicas de bacilos Gram negativos aislados del Manantial Termal del Balneario “Rumiloma”.....	56
Tabla 11-3.	Origen, Morfología y Pruebas bioquímicas de bacilos y cocos Gram positivos aislados del Manantial Termal del Balneario “Rumiloma”.....	59
Tabla 12-3.	Especies de bacterias identificadas del Manantial Termal del Balneario “Rumiloma”.....	62
Tabla 13-3.	Antibiograma de bacilos Gram negativos del Manantial Termal del Balneario “Rumiloma”.....	65
Tabla 14-3.	Antibiograma de bacilos y cocos Gram positivos del Manantial Termal del Balneario “Rumiloma”.....	67
Tabla 15-3.	Presencia fenotípica de metalo β -lactamasas en clones aislados puros Gram negativos del Manantial Termal del Balneario “Rumiloma”.....	68

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A	Balneario “Rumiloma”
ANEXO B	Puntos de muestreo realizados en el Balneario
ANEXO C	Determinación de parámetros in situ (Multiparámetro HANNA)
ANEXO D	Siembra en Petrifilm de las muestras tomadas (Fuente y Chorro de agua)
ANEXO E	Resultados del recuento de bacterias a las 48 horas de incubación de la muestra 1: Fuente
ANEXO F	Resultados del recuento de bacterias a las 48 horas de incubación de la muestra 2: Chorro de agua
ANEXO G	Resultados del recuento de Mohos y Levaduras a los 7 días
ANEXO H	Clones seleccionados para la realización de repiques
ANEXO I	Repique de clones seleccionados
ANEXO J	Estrías de las clones aislados
ANEXO K	Clones aislados puros
ANEXO L	Tinción Gram de clones aislados puros
ANEXO M	Pruebas de identificación de Bacilos Gram positivos
ANEXO N	Prueba de identificación de Cocos Gram Positivos
ANEXO O	Pruebas de identificación de Bacilos Gram negativos
ANEXO P	Pruebas bioquímicas de Bacilos Gram negativos
ANEXO Q	Sistema multipruebas MICROGEN™ GN-ID
ANEXO R	Antibiograma de las especies identificadas
ANEXO S	Antibiograma con EDTA

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía 1	Punto de muestreo (Fuente).....	27
Fotografía 2	Punto de muestreo (Chorro).....	27

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó en muestras de aguas termales obtenidas del Balneario Rumiloma de la parroquia Guangopolo provincia de Pichincha. El desarrollo del análisis microbiológico se llevó a cabo en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Laboratorio de Análisis Bioquímicos y Bacteriológicos de la Facultad de Ciencias, en el que se realizaron diferentes pruebas como la cuantificación de bacterias aerobias mesófilas, coliformes totales, fecales, mohos y levaduras. La metodología utilizada para la cuantificación de microorganismos se realizó por el método de placas Petrifilm™, posteriormente las colonias fueron aisladas mediante repiques en Agar Mueller-Hinton, se realizó la descripción macroscópica, tinción Gram, pruebas bioquímicas y pruebas de sensibilidad antimicrobiana a cada una de las colonias aisladas. Se aislaron e identificaron 11 cepas bacterianas que corresponden a los tipos morfológicos de bacilos Gram negativos (73%), bacilos Gram positivos (18%) y cocos Gram positivos (9%) lo que indica que en el balneario hay prevalencia de bacilos Gram negativos, lo que es característico de aguas termales. Las especies encontradas fueron *Xenorhabdus beddingii* (37%), seguida con un 18% de la bacteria *Brevundimonas diminuta* y con un 9% la presencia de las siguientes bacterias: *Budvicia aquatica*, *Pseudomonas stutzeri*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus spp.* y *Staphylococcus spp.* Es así que en las aguas termales del Balneario Rumiloma se encontró la presencia de una población bacteriana diversa, en la que algunos forman parte de la población autóctona y otros se encuentran en el suelo y aguas superficiales y desde estos hábitats pueden llegar al manantial. Se recomienda realizar estudios periódicos para evitar riesgos en la salud de los usuarios.

PALABRAS CLAVE: <BALNEARIO RUMILOMA> <PICHINCHA [PROVINCIA] >
<AGUAS BICARBONATADA SÓDICA> <AGUAS TERMALES> <MICROBIOTA
AUTÓCTONA> <ANTIBIOGRAMA> <PLACAS PETRIFLIM [MÉTODO] >

SUMMARY

This research was performed based on hot springs samples obtained from Rumiloma spa, Guangopolo parish, Pichincha province. The microbiological analysis was developed at biochemical and bacteriological analysis laboratory of Science Faculty of Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, where aerobic mesophyllic bacteria, total coliforms, fecal coliforms, yeasts and moulds quantifying tests were developed. The microorganisms quantifying methodology was performed by Petrifilm™ plates method, later colonies were isolated by Mueller-Hinton Agar, macroscopic description, Gram staining, biochemical tests and antimicrobial susceptibility testing from each one of isolated colonies were carried out. Eleven bacterial strains were isolated and identified corresponding to the morphological types of Gram negative bacilli (73%), Gram positive bacilli (18%) and Gram coconut positive (9%) indicating that there is the prevalence of Gram negative bacilli in spa, which is characteristic of hot springs. The species found were *Xenorhabdus beddingii* (37%), (18%) *Brevundimonas diminuta* bacteria and (9%) of other bacteria such as: *Budvicia aquatica*, *Pseudomonas stutzeri*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus spp.* and *Staphylococcus spp.* In fact, in hot springs of Rumiloma spa the presence of a diverse bacterial population were found, some of these as part of the native population and others are on the ground and surface water, that is why from these habitats may reach the spring. We recommend that regular studies be done in order to avoid risks to the health of users.

KEY WORDS: <RUMILOMA SPA> <PICHINCHA [PROVINCE]> <SODIUM BICARBONATED WATER> <HOT SPRINGS> <NATIVE MICROBIOTA>

INTRODUCCIÓN

Debido a su ubicación geográfica a lo largo del llamado Cinturón de Fuego del Pacífico, las cuatro regiones de Ecuador: Sierra, Oriente, Costa y Galápagos, cuentan con actividad volcánica. Ello convierte al país en uno de los mejores lugares del mundo para relajarse en un baño termal de aguas ricas en minerales. Los habitantes ancestrales de Ecuador han usado estas aguas cálidas y remotas con poderosos efectos curativos gracias a sus altos contenidos de minerales y sulfuros. (Hopey, 2013. <http://www.ecuadorexplorer.com/es/html/aguas-termales-y-spas.html>)

A medida que crece la popularidad de estos ecosistemas acuáticos, muchos habitantes de los sitios donde estos manantiales se encuentran, han construido balnearios que se convierten en un verdadero paraíso de aguas termales destinado a tratamientos naturales, debido a que tienen diferentes efectos en el cuerpo humano. (Gibert, 2010, p. 2)

Las fuentes de aguas termales poseen una población microbiana autóctona que suele ser característica y que depende de sus propiedades físico-químicas. Son ambientes extremos por sus altas temperaturas, mayor concentración de sales, condiciones que no son favorables para el crecimiento de ciertos seres vivos.

En Ecuador solo existen estudios realizados por el Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología (INAMHI) cuyo objetivo ha sido investigar los parámetros físico-químicos de las fuentes de aguas termo-minerales en el Ecuador.

En vista de que no existen estudios realizados en el Ecuador sobre la importancia de las aguas termales se escogió al Balneario Rumiloma para realizar el estudio, siendo uno de los muchos balnearios con los que cuenta el Ecuador.

El gobierno en la actualidad impulsa el Plan Nacional del Buen Vivir y uno de los principales objetivos es garantizar mejores condiciones de vida fomentando la salud a la que tienen derecho los ciudadanos ecuatorianos, así también al de vivir en un ambiente sano libre de contaminación. Por esta razón el estudio microbiológico evaluará la calidad del agua debido a que a través de ella se pueden adquirir enfermedades que causen daño a los usuarios del balneario.

Este trabajo de investigación tiene como objetivo el estudio microbiológico de las aguas termales del Balneario Rumiloma de la Parroquia Guangopolo perteneciente a la Provincia de Pichincha con el fin de conocer si existe contaminación microbiológica y establecer la presencia de bacterias y

hongos, así también conocer la biodiversidad microbiana de estas aguas termales y garantizar la calidad sanitaria descartando la presencia de microorganismos patógenos para fomentar un turismo de salud indicando los beneficios terapéuticos que tienen dichas aguas.

Los resultados obtenidos se darán a conocer a los administradores y en caso de ser necesario se les sugerirá algún tratamiento sanitario que garantice la calidad y seguridad de los usuarios del balneario.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.1 Aguas Termales

Aquellas aguas minerales que brotan del suelo a una temperatura mayor de 5°C que la temperatura ambiental se las llaman aguas termales. Dichas aguas surgen de capas subterráneas a las cuales se debe su alta temperatura y sus componentes minerales. (Méndez, 2010, p. 4)

Las aguas termales son minero-medicinales, pero no todas las aguas mineromedicinales son termales, ya que podemos encontrar aguas mineromedicinales frías.

1.1.1 Origen de las aguas termales

Según Cibeira, (2000) existen dos tipos de aguas termales de acuerdo a su origen geológico:

- **Magmáticas.-** Estas aguas nacen de filones metálicos o eruptivos su temperatura es por lo general mayor a 50°C y los elementos que comúnmente se encuentran son arsénico, boro, bromo, cobre, fósforo y nitrógeno.
- **Telúricas.-** Conocidas también como aguas de infiltración, son aquellas que pueden surgir de cualquier terreno. Su caudal es variable, según los regímenes de lluvia y estaciones del año. Las temperaturas rara vez llegan a los 50° C y tienen generalmente bicarbonatos, cloruros, sales de calcio y otros.

1.1.2 Características físicas de las aguas termales

- Temperatura en la fuente mayor a 20°C, o superior en 5°C a la temperatura media anual del lugar en el que emergen.
- Contenido total de sólidos disueltos mayor que 1g/L.
- Las especies químicas que asignan el nombre para su clasificación (cloruradas, bicarbonatadas, sulfatadas, etc) deben tener una concentración mayor al 20% respecto a las especies de la misma carga (aniones o cationes). (Carrasco & Naula, 2012, p.82)

1.1.3 Clasificación de las aguas termales

El criterio de clasificación de las aguas termales puede ser asumido desde varios puntos de vista: de acuerdo a su temperatura, a su composición química, a su origen geológico, etc.

1.1.3.1 De acuerdo a su Temperatura

Según el Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología (INAMHI, 2013, p.10) clasifica a las aguas termales de acuerdo a su temperatura en: frías, hipotermas, termales, hipertermas. (Tabla 1-1)

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

Aguas Frías	Menos de 20 °C
Hipotermas	De 20° a 30 °C
Termales	De 30° a 40 °C
Hipertermas	Más de 40 °C

Fuente: INAMHI, 2013. (Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología. Octubre 2013)

1.1.3.2 De Acuerdo a su Composición Química

Las aguas termales cuando presentan más de un gramo por litro de mineralización global, suelen ser clasificadas de acuerdo a su contenido aniónico y catiónico predominante (Cuadro 1-1). (Larraiza, 2014, p. 9)

Cuadro 1-1. Clasificación de las aguas termales de acuerdo a su composición química

Aguas Cloruradas	Proviene de las profundidades de la tierra, sus composiciones son muy variadas. Predomina el anión cloruro y los cationes sobresalientes suelen ser el sodio, el calcio o el magnesio.
Aguas Sulfatadas	Predominan los aniones sulfato con diferentes cationes. La mineralización total debe superar a 1g/L. Su mineralización y temperatura son variables.
Aguas Bicarbonatadas	Predomina el anión bicarbonato y su mineralización global es superior a 1g/L. Suelen ser de baja mineralización y de temperatura de emergencia fría.

Fuente: LARRAIZA, 2014.

1.1.3.3 De Acuerdo a la Cantidad de Residuos Secos

De acuerdo al total de sólidos disueltos, se ha dividido a las aguas termales (Tabla 2-1).

Tabla 2-1. Clasificación de las aguas termales de acuerdo a la cantidad de residuos secos

Oligometálicas	No superior a 110mg/L
Mineralización muy débil	Entre 110 y 250mg/L
Mineralización débil	Entre 250 y 500mg/L
Mineralización media	Entre 500 y 1000mg/L
Mineralización fuerte	Superior a 1000mg/L

Fuente: MARAVER, et al., 2003.

1.1.4 Beneficios de aguas termales

El agua termal tiene varios efectos en el cuerpo humano siendo los más importantes el aumento de temperatura del cuerpo y de la presión hidrostática lo cual conlleva al aumento de la oxigenación y circulación sanguínea ayudando así a la depuración de la sangre y a la eliminación de toxinas del cuerpo mediante la sudoración y diuresis. Las aguas termales presentan propiedades curativas siendo así utilizadas para estimular las defensas del cuerpo, las secreciones del hígado y del tracto digestivo ayudando a la digestión, a más de servir de relajante y sedante para el ritmo de vida actual y para el estrés debido a que sedan al sistema nervioso. Para todos los casos mencionados los baños termales deben efectuarse de 3 a 4 semanas para que haya mayor efectividad, siendo fundamental una consulta previa con un especialista particularmente en caso de embarazos, edad avanzada y enfermedad. (Vitor, 2010, p. 19)

1.2 Control de Calidad de Aguas Minero-Medicinales

Todas las aguas sean minero-medicinales, termales o no poseen características físicas, químicas, microbiológicas mediante las cuales se puede definir sus propiedades y por ende sus aplicaciones. Entre las principales características de las aguas minero-medicinales se encuentran:

- Caudal
- Temperatura
- Otros parámetros físicos: olor, turbidez, pH, conductividad, etc.
- Radiactividad

- Calidad microbiológica: Flora autóctona: algas, hongos, termófilos, mesófilos, aerobios, anaerobios, halófilos, etc.

1.2.1 Caudal

En una estación termal o balneario el caudal de las aguas minero-medicinales puede alterarse por fenómenos naturales sean estos por movimientos sísmicos lejanos o cercanos, por la acumulación de sedimentos en las vías de emergencia del agua formado por fenómenos de su propia composición. Es así que cualquiera de estos factores puede alterar la cantidad de agua minero-medicinal ya sea en su punto de emergencia o de captación ocasionando una imprevista interrupción o un paulatino descenso hasta su agotamiento total. (Rodés, 2000, p.76)

1.2.2 Temperatura

En el punto de emergencia del agua la temperatura no siempre suele ser constante debido a fenómenos del subsuelo el cual puede dar origen a aguas homotérmicas (aquellas que mantienen constante su temperatura) y a aguas heterotérmicas (aquellas que presentan cambios estacionales), por lo que es indispensable conocer el cambio estacional debido a que pueden darse variaciones en las características del agua debiendo realizarse mediciones periódicas para poder detectar algún fenómeno anómalo. (Rodés, 2000, p. 77)

1.2.3 Radiactividad

Hasta el momento no se han determinado límites legales por lo que se suele tomar de referencia los valores guía establecidos para las aguas de consumo público siendo su valor de radiactividad alfa total de 0,1 Bq/L y 1,0 Bq/L para la radiactividad total. En las aguas minero-medicinales el valor de radiactividad es mayor en aguas termales. (Rodés, 2000, p. 80)

1.3 Agua Termal de Rumiloma de la Parroquia Guangopolo

1.3.1 Parroquia Guangopolo (Aquicito, Parroquias del Distrito Metropolitano de Quito, 2014)

Esta parroquia se encuentra ubicada en las faldas del cerro Ilaló, muy cerca del río San Pedro, al este de la ciudad de Quito. Sus atractivos son las piscinas de aguas termales y las artesanías elaboradas con crin de caballo.

Guangopolo es una de las comunidades más antiguas originada de la tribu de los Quitus-Caras. Su nombre surge por la unión de dos reyes provenientes de comunidades diferentes por lo que “Guango” en quichua significa “Princesa” y “Pulu” “Príncipe”.

Guangopolo fue parte de la red de señoríos del Quito preincásico. Durante la época de La Colonia estas tierras estuvieron anexadas a Tumbaco y posteriormente, a Conocoto y Alangasí. En 1953, finalmente Guangopolo se constituyó como parroquia rural del Distrito Metropolitano de Quito la misma que se encuentra al este de Quito a $0^{\circ}15' 33,48''$ S y $78^{\circ}27'8.04''$ W al pie del cerro Ilaló.

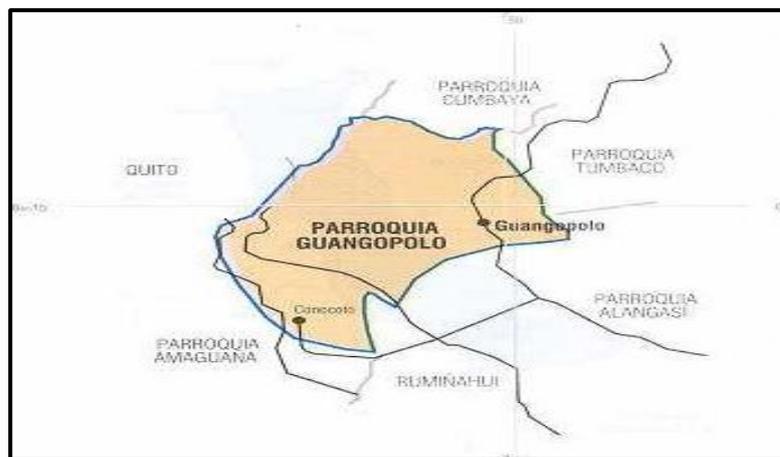


Figura 1-1. Ubicación de la parroquia Guangopolo

Fuente: <http://www.guangopolo.gob.ec/pichincha>.

El área total de Guangopolo es de 29.95 km², a una altura de 2475 m.s.n.m, con una presión atmosférica promedio de 548 milibares, temperatura ambiente anual de 18°C y con humedad relativa alrededor del 76%. El centro poblado de Guangopolo cuenta con una población de 6500 habitantes, dicha parroquia está conformada por tres comunas las cuales son: Rumiloma, Sorialoma y La Toglla.

1.3.2 Agua termal del Balneario Rumiloma (Gobierno Parroquial de Guangopolo, 2008)

El balneario Rumiloma que en idioma ancestral significa “Montaña de piedra” está ubicado en la parroquia Guangopolo, en plena vía Intervalles, entre Tumbaco y El Tingo, el balneario ostenta el privilegio de llenar sus piscinas con agua pura que nace literalmente de las entrañas de una montaña.

Los pobladores de Guangopolo acuden con frecuencia a estas piscinas para disfrutar de sus aguas termales que alcanzan una temperatura de 31,5°C con propiedades minerales curativas

que benefician a la salud, ayudando a mejorar problemas reumáticos, artrosis, artritis, afecciones crónicas del aparato respiratorio como: laringitis, rinitis, bronquitis, asma; así también son tónicos y embellecedores de la piel.

Luego de la remodelación efectuada por el Municipio el balneario Rumiloma cuenta con las siguientes instalaciones: dos piscinas, canchas multiusos, senderos, bar, chozones y un camino para descender hasta el río San Pedro.



Figura 2-1. Ubicación del Balneario Rumiloma

Fuente: <http://deportesyturismo.com/galeria%20B%20Rumiloma.htm>

1.4 Microbiología

Las aguas minero-medicinales en su punto de emergencia presentan una población microbiológica acondicionada a las características del agua como temperatura, oxigenación, nutrientes, pH, etc, no son consideradas aguas estériles a pesar de que surjan a altas temperaturas. La contaminación del agua por microorganismos autóctonos originarios de las capas superiores del suelo de donde son llevadas por aguas de infiltración las mismas que se mezclan con aguas de origen profundo suelen ser un problema que conlleva a graves consecuencias. El agua minero-medicinal puede contaminarse por bacterias especialmente coliformes, estreptococos, clostridios cuya presencia pueden ser señal de la falta de cuidado de la surgencia o captación del agua, así como también la presencia de *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Pseudomonas aeruginosa* indican un riesgo sanitario debido a que son microorganismos patógenos. (Rodés, 2000, p. 80)

1.4.1 Análisis Microbiológico

“Se puede definir el análisis microbiológico como el conjunto de operaciones encaminadas a caracterizar los microorganismos presentes en una muestra”. (Gómez, et al., 2002, p. 535)

1.4.1.1 Microorganismos Totales y Vivos

Se trata de conocer el número total de microorganismos presentes en el agua, este valor es usado como indicador de las características higiénicas generales del agua. Este número no guarda relación con el de microorganismos patógenos puesto que no puede utilizarse como índice de su presencia. (Glynn & Heinke, 1996, p. 274)

1.4.1.2 Microorganismos Indicadores

Los microorganismos indicadores son aquellos cuya presencia indica una posible contaminación o la existencia de patógenos potenciales. (García, et al., 2006, p. 598)

1.4.1.2.1 Bacterias Aerobias Mesófilas

Son bacterias que descomponen la materia orgánica capaces de crecer a temperaturas que oscilan entre 30 y 40 ° C. Este recuento de colonias sirve para determinar el estado de los recursos de agua en su origen y la eficacia del tratamiento e indica la limpieza y el estado de los sistemas de distribución. (Obón, sf, p. 20)

1.4.1.2.2 Coliformes Totales

Son bacterias de morfología bacilar, gram-negativas, aerobias o anaerobias facultativas, no formadoras de endosporas, oxidásas negativas y que fermentan la lactosa con producción de ácido y gas en 24-48 horas a 36°C. (García, et al., 2006, p. 23)

1.4.1.2.3 Coliformes Fecales

Bacterias aerobias gram-negativas, no formadoras de esporas, de forma bacilar y que, incubadas 44,5° C, fermentan la lactosa en un término de 48 horas, con producción de gas, pudiendo ser residentes del tracto digestivo humano y de animales de sangre caliente por lo que se consideran

indicadores de contaminación fecal un ejemplo de este grupo lo constituye la *Escherichia coli*. (Gómez, et al., 2002, p. 535)

1.4.1.2.4 Mohos y Levaduras

Los mohos y levaduras son microorganismos eucariotas ampliamente distribuidos en la naturaleza, la mayoría de ellos son saprofitos pero algunos de ellos pueden llegar a ser dañinos para el ser humano y otros seres vivos llegando a producir diferentes patologías clasificadas como: micosis profundas, oportunistas, subcutáneas y superficiales. (Salgado, 2002, p. 9)

1.5 Microorganismos Presentes en Aguas Termales

1.5.1 *Brevundimonas diminuta*

Brevundimonas diminuta es un bacilo Gramnegativo previamente asignado al género *Pseudomonas*. Son bacterias no fermentadoras de lactosa, aeróbicas, no esporuladas activamente móviles las cuales cuentan con un único flagelo polar, crecen muy rápidamente en una solución de peptona simple a pH óptimo de 7 y a una temperatura óptima alrededor de 35°C. Son microorganismos ambientales con distribución mundial aislados del agua, el suelo, las plantas y ocasionalmente de especímenes clínicos. (Rocha, et al., 2006, p. 239)

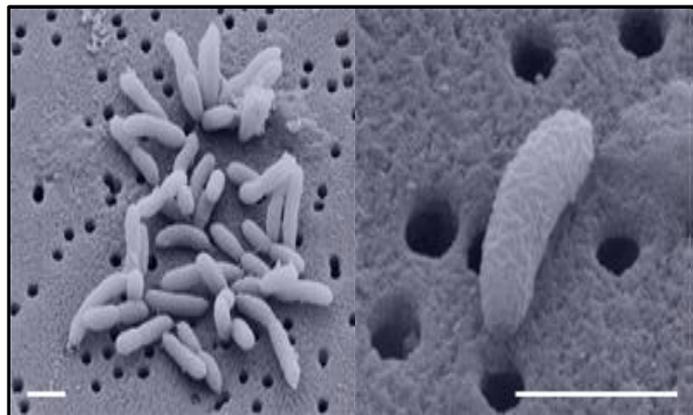


Figura 3-1. *Brevundimonas diminuta*

Fuente: www.microbewiki.kenyon.edu/index.php/Brevundimonas_diminuta

1.5.2 *Xenorhabdus beddingii*

Xenorhabdus beddingii son bacterias Gram-negativas en forma de bastoncillos, colonia de pigmentación amarilla/parda, crecen en medios selectivos por debajo de una temperatura de 37°C, anaerobios facultativos, móviles de la familia de las *Enterobacteriaceae*. Son bacterias

grandes, entomopatógenos que están íntimamente asociados con nematodos, siendo su hábitat normal el lumen intestinal de nematodos o la cavidad del cuerpo de los insectos huésped en la que han sido introducidos por los nematodos. Algunas cepas pueden tener actividad antibacteriana o antifúngica. (Thomas & Poinar, 1979, p. 352)

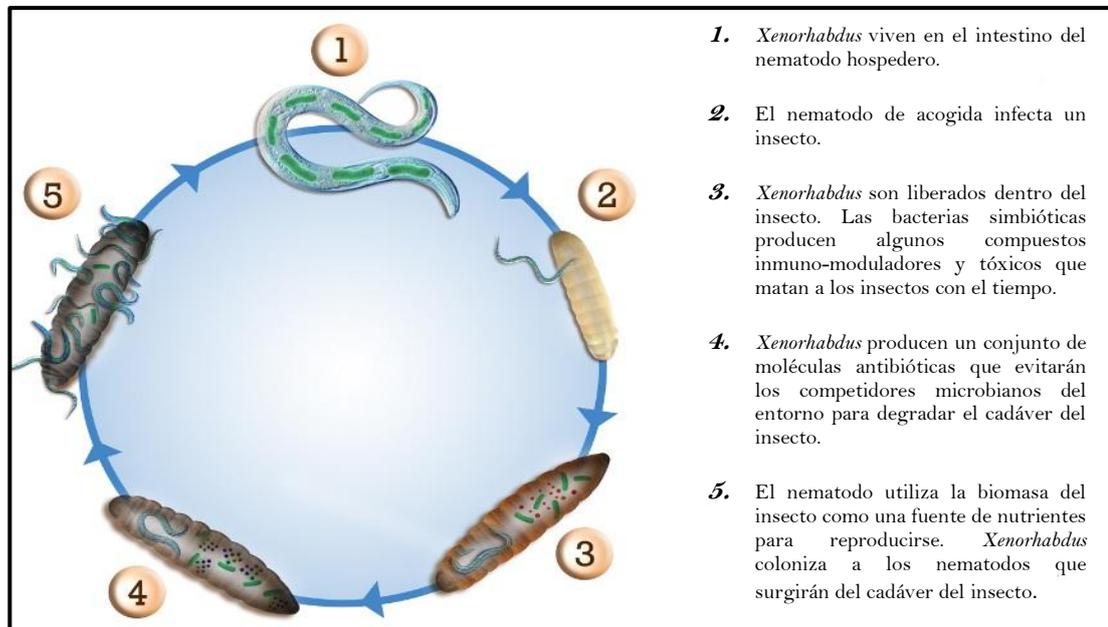


Figura 4-1. *Xenorhabdus beddingii*

Fuente: www.lookfordiagnosis.com

1.5.3 *Budvicia aquatica*

Budvicia aquatica son bacterias Gram-negativas en forma de barra, pueden ser no móviles así como también son capaces de desarrollar flagelos peritricos cuando crecen a 22 ° C, a temperaturas superiores a 37 ° C su motilidad se reduce, no forman esporas y no son encapsulados. Son bacterias capaces de crecer en agar nutritivo a temperaturas entre 4 y 37 ° C, sus colonias son pequeñas, translúcidas con bordes lisos, no colonizan a 42 ° C. Son bacterias de agua dulce que se las puede encontrar en agua potable como también en arroyos, ríos y piscinas no están asociadas con heces o aguas residuales humanas. (Dworkin, et al., 2006, p. 9)

1.5.4 *Pseudomonas stutzeri*

Pseudomonas stutzeri es una bacteria Gram negativa, no esporulada, aerobia que cuenta con un solo flagelo polar, su tamaño es de 1-3µm de largo y 0.5µm de diámetro aproximadamente, sus colonias tienen forma de nervios que irradian desde su centro. Es una bacteria implicada en los procesos de desnitrificación, es decir que puede utilizar nitrato como aceptor de electrones en su

metabolismo en lugar de oxígeno. Es una bacteria ampliamente distribuida en la naturaleza por lo que se considera “casi universal”. (Lalucat, et al., 2006, p. 510)

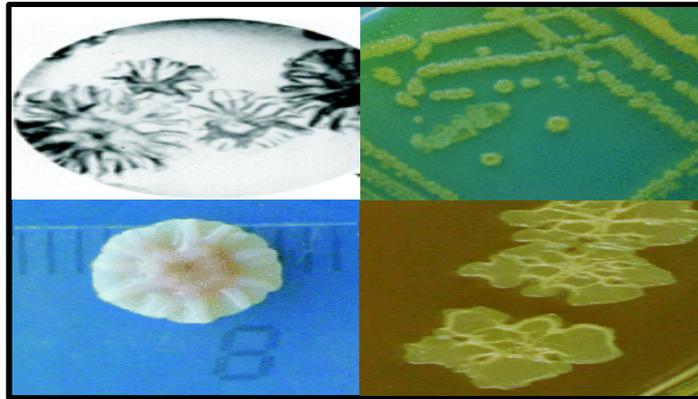


Figura 5-1. *Pseudomonas stutzeri*
Fuente: www.ncbi.nlm.nih.gov

1.5.5 *Bacillus mycoides*

Bacillus mycoides es una bacteria Gram positiva, no móvil, su tamaño oscila entre 1,0- 1,2 x 3,0- 5,0 μm , capaz de formar esporas las cuales pueden ser elipsoidales, central, paracentral o subterminal, no presentan cápsula y los bacilos tienden a presentarse en cadenas. Las colonias son de color blanco a crema opaco y característicamente rizoide, son anaerobios facultativos, crecen a una temperatura máxima de 35 a 40 ° C y como temperatura mínima de 10 a 15°C. (Di Franco, et al., 2002, p. 33)



Figura 6-1. *Bacillus mycoides*
Fuente: www.exploringtheinvisible.com

1.5.6 Género *Staphylococcus*

Son bacterias Gram positivas dispuestas en forma de racimos, anaerobias facultativas, productoras de coagulasa, catalasa, inmóviles, no esporuladas, normalmente no poseen cápsula.

Tras ser incubadas por 24 horas crecen formando colonias lisas, elevadas, brillantes, de bordes enteros, consistencia cremosa, su tamaño suele ser de 1 a 3 mm de diámetro, la mayor parte de cepas presentan un halo de β -hemólisis alrededor de la colonia cuando crecen en medios con sangre. (Pahissa, 2009, p. 17)

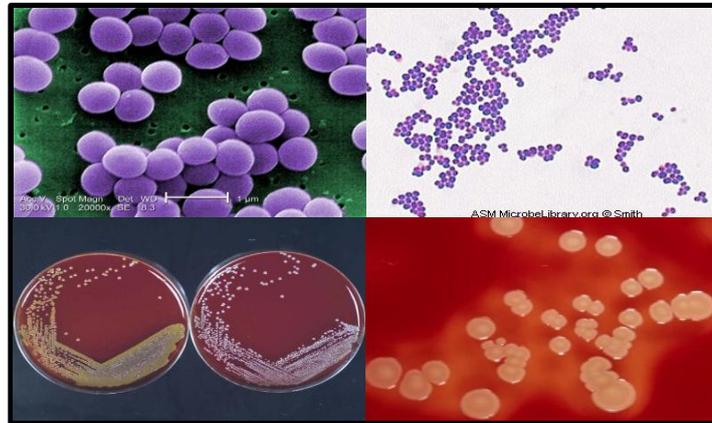


Figura 7-1. *Staphylococcus aureus*

Fuente: http://fundacionio.org/img/bacteriology/cont/Staphylococcus_aureus.html

1.6 Cultivo de Microorganismos

1.6.1 Medios de Cultivo

Son un conjunto de nutrientes que en concentraciones adecuadas y en condiciones físicas óptimas permiten el desarrollo de los microorganismos. Estos nutrientes aportan energía y elementos químicos para la síntesis de los constituyentes celulares de un microorganismo. Los medios de cultivo se encuentran constituidos químicamente de sales inorgánicas (macroelementos y microelementos), una fuente de energía y de carbono para el metabolismo (generalmente un azúcar), complementos orgánicos (principalmente vitaminas, y fuente de nitrógeno reducido), reguladores de crecimiento y un gelificante. (Barrios & Berthouly, 1987, p. 2)

1.6.1.1 Condiciones generales para el cultivo de microorganismos

En un medio de cultivo el crecimiento de microorganismos se ve afectando por varios factores que en ciertos casos son ajenos al propio medio. Por lo tanto se debe tener en cuenta:

- Disponibilidad de nutrientes apropiados
- Consistencia del medio
- Presencia o ausencia de oxígeno y otros gases
- Condiciones adecuadas de humedad
- Luz ambiental

- pH
- Temperatura
- Esterilidad del medio (Casado, et al., 2012, p. 4)

1.6.1.2 Clasificación de medios de cultivo

Los medios de cultivo se pueden clasificar de acuerdo a su utilización. (Cuadro 2-1)

Cuadro 2-1. Clasificación de los medios de cultivo según su utilización

BÁSICOS	Agar Nutritivo	Es un medio rico utilizado generalmente para el crecimiento de todo microorganismo.
	Caldo Cerebro Corazón (BHI)	Medio utilizado para el crecimiento de una gran variedad de microorganismos, con frecuencia usado como medio para hemocultivo
	Agar Triptona de Soya (TSA)	Medio rico generalmente usado para el crecimiento de una variedad amplia de microorganismos, con frecuencia usado como agar base.
ENRIQUECIDOS	Agar Sangre	Medio empleado para el aislamiento de la mayoría de microorganismos.
	Agar Mueller-Hinton	Medio de cultivo rico, utilizado especialmente para hacer ensayos de sensibilidad y estandarización de pruebas de susceptibilidad.
SELECTIVOS	Agar Manitol	Medio selectivo para estafilococos por su alta concentración de cloruro sódico, utilizado como indicativo de la presencia de <i>Staphylococcus aureus</i> .
	Agar Sabouraud	Medio utilizado para el cultivo de hongos patógenos especialmente para el aislamiento primario de dermatófitos, con el agregado de cicloheximida y cloranfenicol.
DIFERENCIALES	Agar MacConkey	Utilizado para el aislamiento de bacterias gram negativas (Enterobacterias).
	Agar Eosina azul de metileno (EMB)	Empleado para el aislamiento de bacterias gram negativas (Enterobacterias).
	Agar TSI (Agar Triple Azúcar Hierro)	Medio que determina la fermentación de carbohidratos y la producción de ácido sulfhídrico, características que son utilizadas para la diferenciación de Enterobacterias.

Fuente: CASADO, M^a, et al. 2012.

1.7 Identificación de Microorganismos

1.7.1 Morfología Bacteriana

La morfología bacteriana debe estimarse desde dos puntos de vista:

- Características macroscópicas de las bacterias.
- Características microscópicas de las bacterias.

1.7.1.1 Características macroscópicas de las bacterias

En este apartado se incluye el estudio de los aspectos macroscópicos o visibles de las bacterias. Las células microbianas suelen reproducirse con rapidez ya sea en 18 - 24 horas dándose así la aparición de masas visibles de células sobre medios sólidos denominadas colonias. Las colonias poseen una morfología característica (Cuadro 3-1) la cual es estudiada a simple vista o con la ayuda de una lupa. (Montoya, 2008, p. 22)

Cuadro 3-1. Características morfológicas de las bacterias

FORMA	Puntiforme, circular, irregular, filamentosa, rizoide u ovalada.
TAMAÑO	Se mide en mm.
ELEVACIÓN	Plana, elevada, convexa.
BORDE	Entero, ondulado, lobulado, dentado, filamentoso y rizado.
SUPERFICIE	Lisa, rugosa, plegada.
CONSISTENCIA	Cremosa, membranosa.
COLOR	Presencia de colores característicos y difusión de pigmentos en el medio.
LUZ TRANSMITIDA	Opaca, translúcida y transparente.
LUZ REFLEJADA	Opaca, brillante.

Fuente: DÍAZ, G. 2010.

1.7.1.2 Características microscópicas de las bacterias

En esta sección se estudia la estructura de las bacterias como pared celular, membrana citoplasmática y citoplasma, además de otros organelos citoplasmáticos. La forma de las bacterias al microscopio está establecida por la rigidez de su pared celular, por lo que se diferencian según su forma en cocos (esféricas u ovaladas), bacilos (cilíndrica o de bastones; rectos o curvos) y espirilos (espiral). Las bacterias pueden permanecer unidas unas con otras después de la división celular conservando siempre su independencia celular. En caso que su plano de división sea único, se puede encontrar diplococos o cocos en cadena (microorganismos del género *Streptococcus*), pero si los planos de división son muchos, pueden agruparse los cocos en tétradas o en racimos (*Staphylococcus*), los bacilos pueden ser muy cortos (cocobacilos) o muy largos. Sus extremos pueden ser redondeados o rectos; estar aislados, en cadenas o en filamentos. La morfología bacteriana debe ser observada con el microscopio óptico o el microscopio electrónico, debido al tamaño pequeño de estos microorganismos. (Bado, et al., 2008, p. 24)

1.7.1.2.1 Tinción Gram

El bacteriólogo danés, Christian Gram, en 1884 desarrolló una técnica de tinción a través de la cual se puede separar a las bacterias en dos grandes grupos: Gram positivas y Gram negativas, fundamentada en si retienen o no, el colorante primario (cristal violeta) luego del proceso de decoloración. La tinción de Gram se basa en las características de la pared celular de los microorganismos, la cual le confiere propiedades determinantes a cada bacteria. (López, et al., 2014, p. 12)

En las bacterias Gram negativas su pared celular está constituida por una fina capa de peptidoglicano y una membrana celular externa compuesta de fosfolípidos, lipoproteínas y lipopolisacáridos, mientras que la pared celular de las bacterias Gram positivas es gruesa y está constituida por peptidoglicano y ácido teicoico, pero no cuentan con membrana celular externa. Los organismos que retienen el cristal violeta luego de añadir el agente decolorante, el alcohol, aparecen como azul oscuro o violeta, designándolo como gram positivos; mientras que son asignados como gram negativos aquellos que pierden el cristal violeta y se tiñen con el colorante secundario, la safranina, apareciendo de color rojo. Un examen meticuloso de un extendido bacteriano teñido diferencialmente, proporciona una información muy significativa sobre la identificación y caracterización morfológica de la muestra. (López, et al., 2014, p. 12)

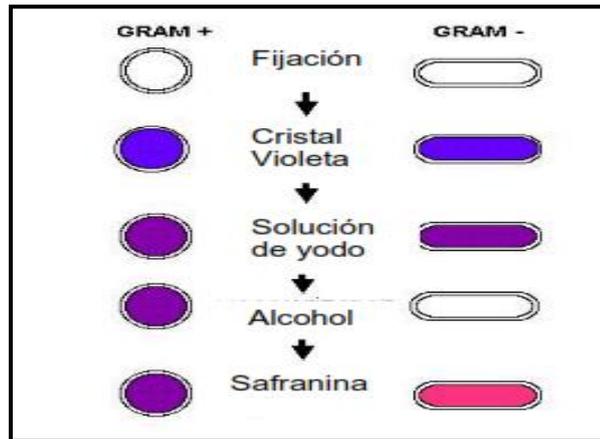


Figura 8-1. Tinción Gram
Fuente: VIZCARRONDO, M. 2011.

1.7.2 Placas Petrifilm

Las placas Petrifilm han sido diseñadas para el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) en muestras de agua y alimentos. Consiste en delgadas láminas con un medio de cultivo y un agente solidificante soluble en agua, también pueden estar recubiertas por una película de polipropileno para atrapar el gas producido por ciertas bacterias. Además de tener incorporados indicadores de pH los cuales colorean las colonias facilitando su identificación, así como una cuadrícula para realizar el recuento de las UFC. Se han diseñado placas para recuento aeróbico, de coliformes, *Escherichia coli*, mohos, levaduras, etc. (Rodríguez, et al., 2005, p. 141)

Las placas Petrifilm tienen ventajas sobre las placas Petri tradicionales, debido a que ocupan menor espacio, se almacenan por más tiempo y son fáciles de manipular en el laboratorio; algunos tipos de placas Petrifilm permiten hacer recuentos bacterianos en menos tiempo que el requerido en los métodos tradicionales. (Rodríguez, et al., 2005, p. 141)



Figura 9-1. Placas Petrifilm
Fuente: www.edicionesespeciales.elmercurio.com

1.8 Pruebas Bioquímicas

Las pruebas bioquímicas sirven generalmente para determinar la actividad de una vía metabólica partiendo de un sustrato el cual es incorporado en un medio de cultivo y que la bacteria al crecer lo transforma o no, una vez conocida su reacción permite identificar diferentes microorganismos presentes. Las actividades que se determinan con mayor frecuencia son la capacidad para fermentar carbohidratos, para catabolizar aminoácidos y urea. (Aquiahuatl, et al., 2012, p. 29)

1.8.1 Oxidasa

Es una prueba que se fundamenta en la identificación de una enzima bacteriana de nombre citocromo C oxidasa. El sistema citocromooxidasa se encuentra en microorganismos aerobios o microaerófilos y anaerobios facultativos. La reacción de la oxidasa se da debido a que la enzima citocromo C oxidasa le quita electrones al citocromo C, estos electrones son transferidos por la enzima al oxígeno molecular siendo este el último receptor de electrones en la cadena respiratoria, debido a que el oxígeno tiene un exceso de electrones puede atraer átomos de hidrógeno formando agua o peróxido de hidrógeno. Los diferentes colorantes para la prueba de oxidasa son aceptores de electrones artificiales, la presencia de un color violeta a negro indica la positividad de la prueba. (Silva, et al., 2006, p. 187)



Figura 10-1. Prueba Oxidasa

Fuente: www.scielo.org.co

1.8.2 Catalasa

La catalasa es un enzima que se encuentra presente en la mayoría de microorganismos aerobios estrictos, facultativos y anaerobios aerotolerantes que poseen citocromos, su principal objetivo es separar *Micrococacceae* (positiva) de *Streptococcus spp.* y *Enterococcus spp.* (negativa). La

enzima catalasa descompone al peróxido de hidrógeno en agua y en oxígeno molecular, cuya reacción se da con dos moléculas de peróxido de hidrógeno, actuando una de ellas como sustrato reducido y la otra como donador de átomos de hidrógeno. La producción rápida de burbujas cuando el cultivo bacteriano se mezcla con peróxido de hidrógeno se interpreta como prueba positiva. (Rodríguez, et al., 2005, p. 217)



Figura 11-1. Prueba Catalasa
Fuente: aprendeonline.udea.edu.co

1.8.3 Oxidación- Fermentación (OF)

El uso de hidratos de carbono por parte de bacterias puede darse por vía oxidativa (proceso aeróbico, presencia de oxígeno) o por vía fermentativa (proceso anaeróbico, ausencia de oxígeno). El agar OF es utilizado para poder identificar si bacilos Gram negativos usan hidratos de carbono oxidativa o fermentativamente, o si no los utilizan del todo lo cual tiene importancia taxonómica. La producción de ácido provoca disminución del pH en el medio y este se detecta mediante el viraje del indicador rojo de fenol a amarillo en caso que sea fermentativa, mientras que durante la degradación oxidativa la cantidad de ácidos formados es mucho menor. (Rodríguez, et al., 2005, p. 275)

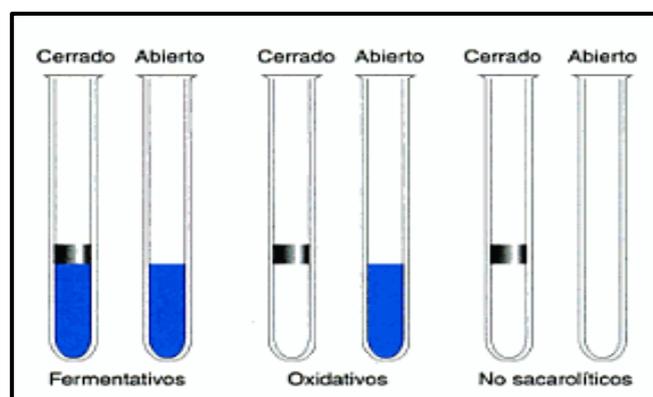


Figura 12-1. Prueba Oxido-Fermentación (OF)
Fuente: KONEMAN, E. 2006.

1.8.4 Agar Hierro de Kligler (KIA)

Esta prueba se basa en la capacidad que tiene un microorganismo de fermentar dos azúcares (glucosa y lactosa) los cuales son incorporados a un medio de crecimiento básico así como también la de producir ácido sulfhídrico y gas. Es una prueba usada en la identificación de bacilos Gram negativos especialmente de la familia *Enterobacteriaceae*. Cuando existe fermentación de glucosa se aprecia el cambio a amarillo del indicador de pH (rojo de fenol) únicamente en la parte inferior del tubo, en la fermentación de lactosa se pone de manifiesto por el cambio a amarillo del indicador, tanto en el fondo del tubo como en la superficie, la producción de gas en la fermentación se aprecia por la aparición de burbujas, rotura o elevación del agar del fondo del tubo y en caso de producción de H₂S se observa un ennegrecimiento del medio en la línea de inoculación o sobre la capa superficial. (García & Silva, 2004, p. 125)

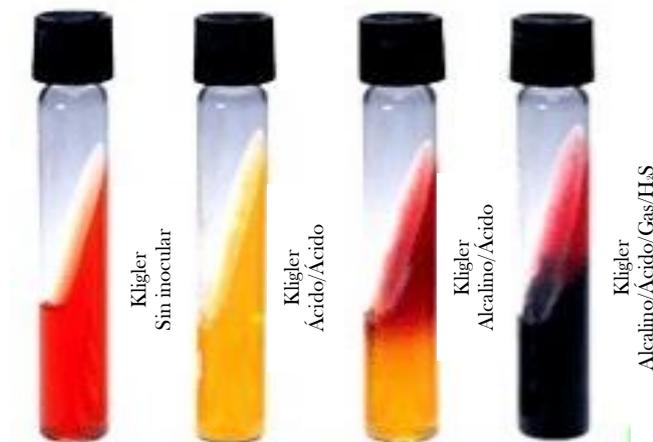


Figura 13-1. Prueba Kligler
Fuente: ARANGUREN, Y. 2011.

1.8.5 SIM (Sulfhídrico Indol Movilidad)

EL SIM es un medio semisólido sin hidratos de carbono el cual sirve para determinar si un microorganismo es capaz de liberar ácido sulfhídrico por acción enzimática sobre aminoácidos que contienen azufre produciendo una reacción visible de color negro. (Bailón, et al., 2003, p. 92)

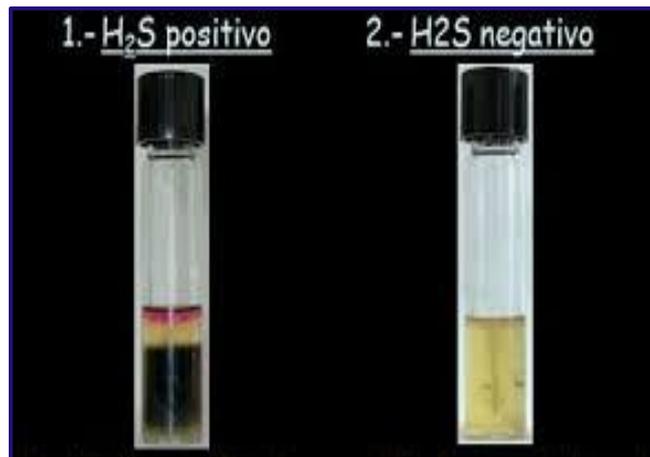


Figura 14-1. Prueba SIM (Producción de H₂S)

Fuente: www.microbiologia-monitoria.weebly.com/medios-diferenciales.html

El indol es uno de los productos de degradación del metabolismo del aminoácido triptófano. La presencia de la enzima triptofanasa en el microorganismo provoca la degradación del triptófano y su desaminación, produciendo indol, ácido pirúvico y amoníaco. El indol se puede detectar en un medio adecuado observando el desarrollo de un color rojo después de agregar el reactivo de Kovacs indicando una prueba positiva. (Sahm & Weissfeld, 2009, p. 244)

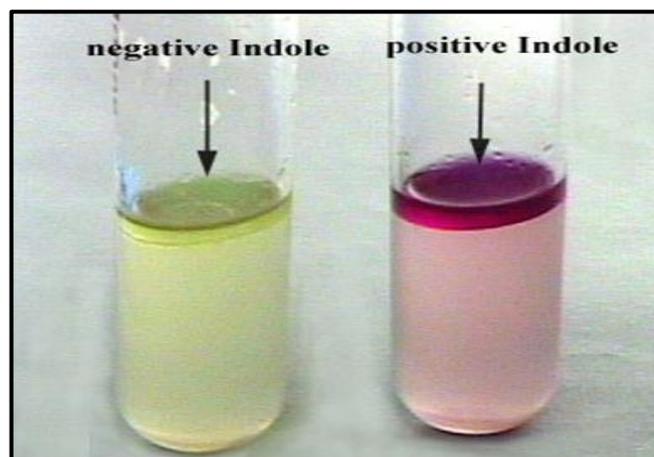


Figura 15-1. Prueba SIM (Indol)

Fuente: www.slideplayer.es/slide

La movilidad bacteriana es otra característica importante en la identificación final de especie, esta prueba se interpreta realizando un cuidadoso examen macroscópico del medio para observar una zona de desarrollo difuso que parte de la línea de inoculación. (Marrero, 2006, p. 8)

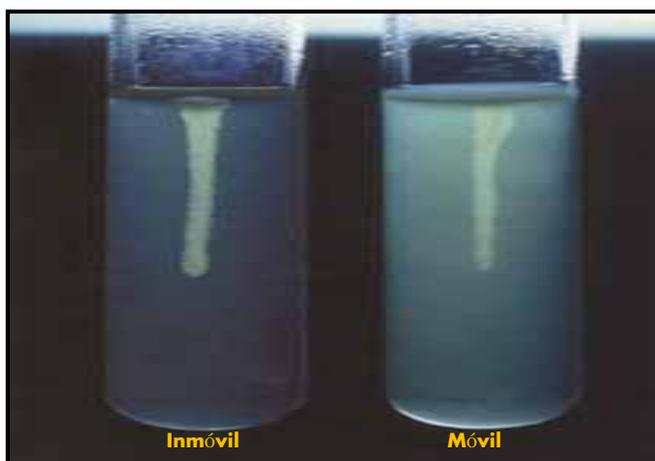


Figura 16-1. Prueba SIM (Movilidad)

Fuente: WELLS, J. 2003.

1.8.6 Citrato

Mediante esta prueba se define si un microorganismo es capaz de usar citrato como única fuente de carbono para el metabolismo. El medio contiene citrato de sodio como fuente única de carbono y fosfato de amonio como única fuente de nitrógeno. El indicador de pH es el azul de bromotimol el cual en presencia de alcalinidad vira al color azul indicando que la prueba es positiva. (Silva, et al., 2006, p. 64)

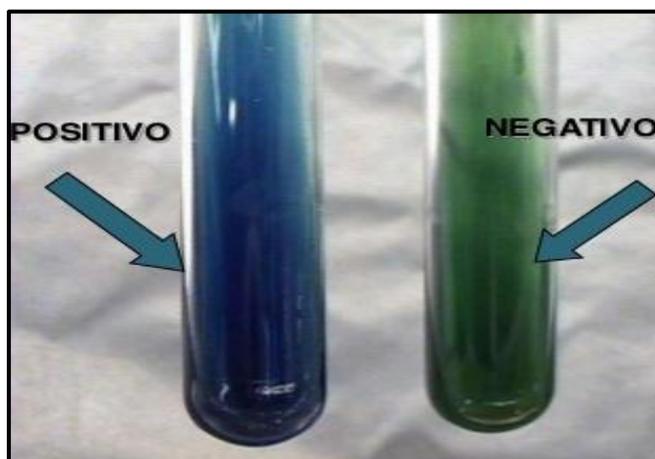


Figura 18-1. Prueba Citrato

Fuente: IZURIETA, N. 2011.

1.8.7 Reacción de la Ureasa

Mediante esta prueba se puede determinar la capacidad de un microorganismo de desdoblar la urea mediante la formación de dos moléculas de amoníaco por acción de la enzima ureasa. Esta actividad enzimática es característica de todas las especies de *Proteus* y se usa sobre todo para diferenciar este género de otras enterobacterias. El indicador de pH es rojo de fenol, el cual en

alcalinidad vira a un color violeta indicando una prueba positiva y al presentar un color amarillo la prueba será negativa. (Bailón, et al., 2003, p. 69)

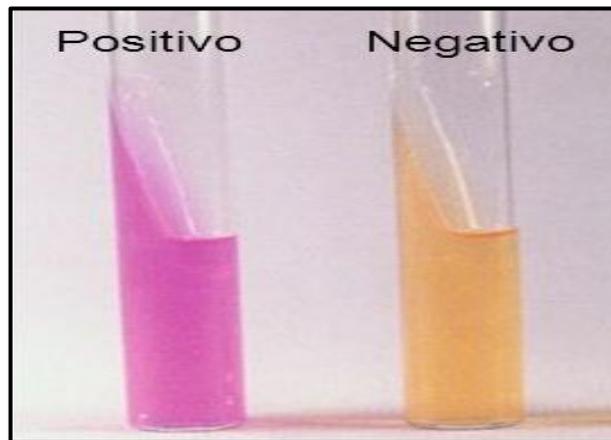


Figura 18-1. Prueba Ureasa
Fuente: OSUNA, M. 2011.

1.8.8 Hidrólisis de Almidón

Esta prueba permite determinar si un microorganismo es capaz de hidrolizar el almidón por acción de una enzima denominada amilasa, esta enzima es muy común en distintos miembros del género *Bacillus*. Cuando el almidón (amilosa) es hidrolizado por acción de exoenzimas amilasas, se degrada a maltosa (disacárido de dos glucosa) y glucosa. Estos azúcares son transportados al citoplasma de la célula y usados como fuente de carbono y fuente de energía. Al agregar la solución de lugol se formará un color azul si la bacteria no hidroliza el almidón, mientras que la aparición de una zona clara alrededor de las colonias significa la hidrólisis del almidón. (Olivas & Alarcón, 2004, p. 35)

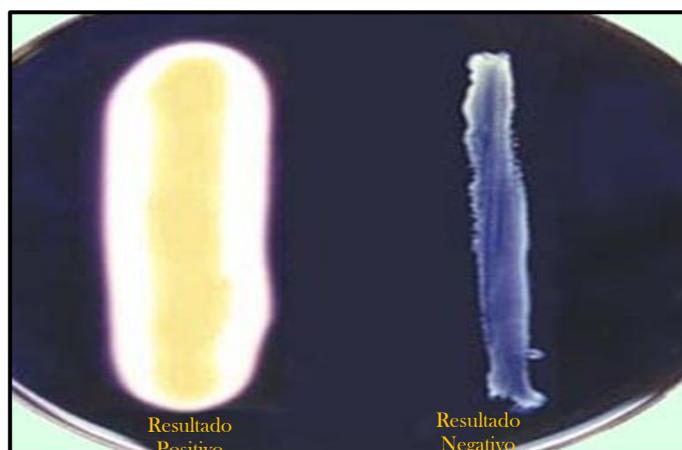


Figura 19-1. Hidrólisis de Almidón
Fuente: MILIAN, T. 2012.

1.8.9 Hidrólisis de Gelatina

Esta prueba muestra la capacidad de ciertos microorganismos para hidrolizar la gelatina a péptidos y aminoácidos, a través de la acción de enzimas específicas denominadas gelatinasas. Un precipitado blanco tras la adición del reactivo cloruro mercurico ácido indica la presencia de gelatina no hidrolizada y la ausencia del precipitado en la región de crecimiento bacteriano indica hidrólisis de la gelatina. (Bailón, et al., 2003, p. 48)

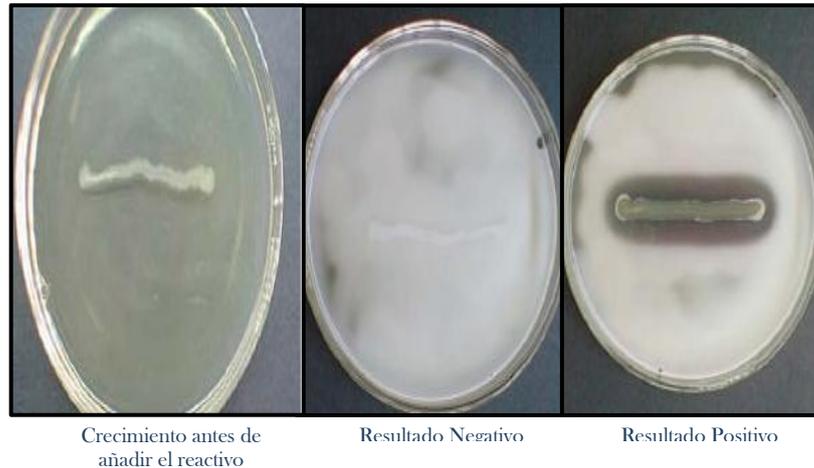


Figura 20-1. Hidrólisis de Gelatina

Fuente: www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/gelatina.pdf

1.9 Sistema Multipruebas (MICROGEN™ GN-ID)

El sistema Microgen GN-ID es un método rápido que permite la identificación de microorganismos de la familia *Enterobacteriaceae* y otros bacilos no exigentes Gram negativos a través de la realización de diferentes pruebas bioquímicas. Este sistema utiliza dos tiras por separado (GN A y GN B) en la cual cada tira contiene 12 substratos bioquímicos, es un dispositivo de plástico con una serie de pequeños depósitos, denominados microposillos y que contienen los substratos deshidratados para diversas pruebas como fermentación de carbohidratos, determinación de la producción de H₂S, determinación de la hidrólisis de la gelatina, etc; las cuales se reconstruyen con la suspensión bacteriana. (Rodríguez, et al., 2005, p. 323)

Las reacciones se leen luego de un periodo de incubación generalmente de 18 a 24 horas, ya sea directamente por el desarrollo de un color o bien después de agregar los reactivos reveladores del producto de reacción. En el mercado se encuentra una variedad de galerías para ser usadas en la identificación de diversos tipos de microorganismos, por lo que todos estos sistemas tienen el mismo fundamento, se diferencian en el número y tipo de pruebas que permiten realizar,

puesto que su selección está directamente relacionada con la actividad metabólica del género al que pertenece el microorganismo a identificar. (Rodríguez, et al., 2005, p. 323)



Figura 21-1. Galerías Microgen™
Fuente: <http://www.labm.com/identification-and-confirmation>

1.10 Pruebas de sensibilidad antimicrobiana

La mayor parte de las bacterias de importancia clínica pueden adquirir y demostrar resistencia a los agentes antimicrobianos que se utilizan en forma frecuente para tratar las infecciones que causan. Una vez que se aísla un microorganismo en el laboratorio su caracterización con frecuencia incluye pruebas para detectar resistencia a los antimicrobianos. Los procedimientos utilizados para determinar los perfiles de sensibilidad y detectar resistencia a los agentes que pueden usarse con fines terapéuticos se denomina pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos. (Sahm & Weissfeld, 2009, p. 187)

1.10.1 Antibiograma

Es uno de los métodos más utilizados que se fundamenta en el enfrentamiento de un inóculo bacteriano estandarizado a una única concentración o a un rango de concentraciones de un antibiótico determinado. La interpretación de los resultados obtenidos permite clasificar los microorganismos en categorías clínicas (sensible, intermedio, resistente) que guían la elección del antimicrobiano ante un proceso infeccioso. (Zaragoza, et al., 2008, p. 55)

1.10.1.1 Difusión con disco

La técnica de difusión con discos debido a su sencillez es una de las más utilizadas, emplea discos de papel impregnados con una solución estandarizada del antibiótico que se disponen sobre la superficie con una suspensión bacteriana. Dicha prueba se fundamenta en la presencia o

ausencia de una zona de inhibición de crecimiento la cual es medida en milímetros. La interpretación de la prueba está basada en la correlación entre el diámetro de la zona de inhibición (mm) con la concentración mínima inhibitoria ($\mu\text{g/mL}$) para cada antimicrobiano y microorganismo. (Zaragoza, et al., 2008, p. 57)

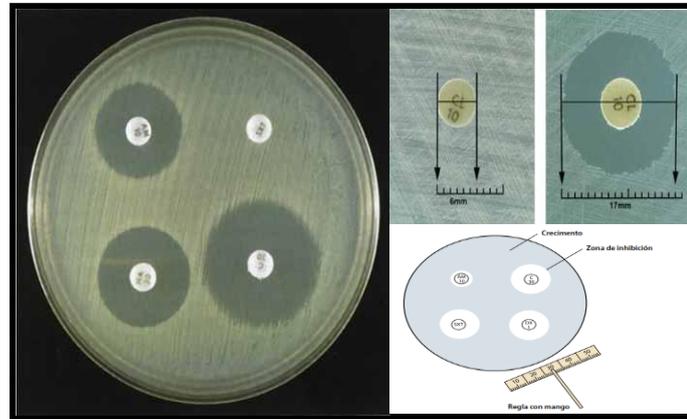


Figura 22-1. Antibiograma por difusión de disco
Fuente: ELLIOTT, J. 2003.

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1 Lugar de Investigación

El trabajo de investigación se realizó en el Balneario “Rumiloma” ubicado en la Parroquia Guangopolo, Provincia de Pichincha lugar en el que se efectuó el muestreo y pruebas in situ. El desarrollo del análisis microbiológico se realizó en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Laboratorio de Análisis Bioquímicos y Bacteriológicos de la Facultad de Ciencias.



Fotografía 1: Punto de muestreo (Fuente)
Fuente: JACHO, K., 2015



Fotografía 2: Punto de muestreo (Chorro)
Fuente: JACHO, K., 2015

2.2 Unidad de Análisis

- Muestras de agua termal.

2.3 Factores de Estudio

- Población: Aguas termales del Ecuador.
- Muestra: Agua del manantial termal del Balneario Rumiloma de la Parroquia Guangopolo Cantón Quito Provincia de Pichincha.

2.4 Tamaño de Muestra

- Durante el proceso de estudio se realizaron dos muestreos (ojo de agua y chorro) por duplicado.

2.5 Materiales, Equipos, Reactivos

2.5.1 Materias Primas y/o Muestras

- Agua termal

2.5.2 Materiales

- Tubos de ensayo
- Pinzas para tubos
- Gradilla
- Probetas 50 y 100mL
- Erlenmeyer 500 mL
- Mechero
- Reverbero
- Pipetas 100 y 1000 μ L
- Puntas amarillas y azules
- Asa de inoculación
- Placas porta y cubre objeto
- Parafilm
- Placas 3M Petrifilm: Aerobios totales, *E. coli*/ Coliformes, Staph Express, Mohos y Levaduras
- Tiras indicadoras de pH
- Palillos
- Cajas petri
- Envases de plástico estéril
- Cooler
- Guantes
- Mascarilla
- Cofia

2.5.3 Equipos

- Balanza analítica
- Estufa
- Multiparámetro

- Microscopio
- Cámara de flujo
- Autoclave

2.5.4 Reactivos

- Cristal violeta
- Lugol
- Alcohol-acetona
- Safranina
- Medios de cultivo

2.6 Métodos y Técnicas

2.6.1 Muestreo

La muestra se tomó del chorro y del punto de donde emerge el agua. El volumen de la muestra necesaria depende de las determinaciones a realizarse, siendo importante la homogeneidad de la muestra y que durante su extracción no se alteren las propiedades del agua que se va analizar.

La extracción del agua se realizó con un recipiente de plástico estéril una vez destapado se sumergió para extraer el agua, para ello se debió mover el recipiente en semicírculo, una vez lleno se levantó y tapó rápidamente dejando un espacio de aire después de colocar la tapa. Esto permitió mezclar la muestra antes del análisis y evitar una contaminación accidental. La muestra fue transportada al laboratorio a temperatura ambiente.

A la muestra recogida se la puede identificar rotulando el recipiente con una etiqueta en la cual conste lo siguiente:

- Localización y nombre del sitio del muestreo
- Detalles del punto de muestreo
- Fecha de la recolección
- Método de recolección
- Hora de la recolección
- Nombre del recolector
- Condiciones atmosféricas (temperatura, lluvia, clima, etc.).
- Datos recogidos en el campo (NTE INEN 2176:2013)

2.6.2 Análisis Físico-Químico

Se realizó un muestreo in situ utilizando el Multiparámetro HANNA para lo cual se sumergió la sonda en el agua y a continuación se determinó los siguientes parámetros: temperatura, conductividad y sólidos totales; y para tomar la temperatura del ambiente se utilizó un termómetro de mercurio.

2.6.3 Análisis Microbiológico

Una vez transportada la muestra al laboratorio se procedió a realizar el análisis antes de las 48 horas según la norma NTE INEN 2169:2013.

2.6.3.1 Recuento de bacterias aerobias mesófilas, coliformes totales y fecales, Staphylococcus aureus, mohos y levaduras por el método de placas con película secas rehidratables petrifilm

La placa petrifilm se colocó en una superficie plana, posteriormente se alzó el film superior, en el centro del film inferior de la placa petrifilm se colocó 1 mL de la muestra, se bajó con cuidado el film superior evitando la formación de burbujas de aire. Sobre el inóculo se ubicó el aplicador para distribuir la muestra de forma homogénea, luego se alzó el aplicador dejando de 2 a 5 minutos para que solidifique el gel. Las placas se incubaron a 35°C boca arriba, finalmente se realizó la lectura de las placas reportando los resultados en UFC/mL.

2.6.3.2 Descripción macroscópica de las colonias

Una colonia es una agrupación de bacterias formada a partir de la reproducción de una Unidad Formadora de Colonia (UFC) sobre un medio sólido la cual puede variar en su tamaño pero es visible a simple vista, por tal razón es importante anotar la morfología que presenta la colonia aislada. Por lo que se realizó la descripción macroscópica de las colonias de acuerdo a las siguientes características:

- Forma
- Borde
- Color
- Elevación
- Superficie
- Consistencia
- Luz transmitida

- Tamaño

2.6.3.3 Estabilización del aislado bacteriano

De cada placa de petrifilm sembrada (bacterias aerobias mesófilas, coliformes fecales y totales, *Staphylococcus*) se escogió al menos un representante bacteriano de cada tipo de las colonias obtenidas por ejemplo colonias que crecieron primero y las de mayor tamaño. Luego se preparó el medio de cultivo Mueller Hinton, en cuya base de la placa se colocó una cuadrícula para inocular cada colonia que fue seleccionada. Se realizará al menos 3 repiques para estabilizar al aislado bacteriano, consiguiendo así un crecimiento de las colonias inoculadas. Finalmente el último repique fue sembrado por agotamiento para la obtención de clones puros.

2.6.3.4 Tinción Gram del aislado bacteriano puro

Se preparó 2 extensiones de bacterias para lo cual en una placa porta objeto se colocó una gota de suero fisiológico, luego con un palillo se tomó una parte de la colonia y se mezcló, se fijó el extendido preparado por calor. Se recubrió la extensión con cristal violeta por un minuto, se lavó con agua corriente cuidando que no se arrastre la preparación. Se recubrió la extensión con lugol por un minuto, luego se lavó, se decoloró con alcohol-acetona aproximadamente 30 segundos, posteriormente se lavó con agua corriente. Se recubrió la extensión con safranina por un minuto, nuevamente se lavó con agua corriente y se dejó secar la preparación al aire. Luego se colocó una gota de aceite de inmersión sobre la preparación y se observó al microscopio con lente de 100X. (García, et al., 1997, p. 23)

2.6.4 Pruebas Bioquímicas del aislado bacteriano puro

Estas pruebas bioquímicas son utilizadas para determinar la actividad de una vía metabólica partiendo de un sustrato el cual es incorporado en un medio de cultivo y que la bacteria al crecer lo transforma o no, una vez conocida su reacción permite identificar diferentes microorganismos presentes. (Aquiahuatl, et al., 2012, p. 29)

2.6.4.1 Oxidasa

Con un palillo de madera se tomó una pequeña cantidad del aislado bacteriano puro y se colocó en la tira reactiva de oxidasa, en segundos la presencia de un color violeta a negro indicó la positividad de la prueba. (Silva, et al., 2006, p. 187)

2.6.4.2 *Catalasa*

Con un asa o palillo de madera se tomó una parte de la colonia bacteriana y se colocó en la superficie de un portaobjetos, se añadió una gota de peróxido de hidrógeno (H_2O_2). La producción rápida de burbujas fue interpretada como prueba positiva. (Rodríguez, et al., 2005, p. 217)

2.6.4.3 *Oxidación-Fermentación (OF)*

Se inocularon dos tubos con el medio O-F mediante siembra en picadura hasta la mitad del medio. Uno de los tubos quedó expuesto al aire mientras que al otro se le añadió vaselina estéril. Se incubó a $37^\circ C$ por 24 horas. La prueba es positiva si el tubo abierto presenta un color ligeramente amarillo en la superficie (vía oxidativa), si el tubo cerrado presenta un color amarillo que empieza desde el fondo del tubo (vía fermentativa), en caso de presentar un color verde o azulado indica que no hay producción de ácidos. (Rodríguez, et al., 2005, p. 275)

2.6.4.4 *Kligler*

Se inoculó el medio mediante estría por picadura y siembra en estría en la superficie inclinada. Se incubó por 24 horas a $37^\circ C$. La presencia de un color amarillo únicamente en la parte inferior del tubo indica fermentación de glucosa, el cambio de color (amarillo) tanto en el fondo del tubo como en la superficie indica que existe fermentación de lactosa y glucosa, la producción de gas en la fermentación se aprecia por la aparición de burbujas, rotura o elevación del agar del fondo del tubo y en caso de producción de H_2S se observa un ennegrecimiento del medio en la línea de inoculación o sobre la capa superficial. (García & Silva, 2004, p. 125)

2.6.4.5 *SIM (Sulfhídrico Indol Movilidad)*

Se tomó una colonia pura de 24 horas y en un medio semisólido de SIM se procedió a sembrar por punción profunda con aguja de inoculación hasta la mitad del medio. Se incubó por 24 horas a $37^\circ C$, luego de la incubación se añadió 2 gotas del reactivo de Kovacs por la pared del tubo. La reacción visible de un color negro indica producción de ácido sulfhídrico, la presencia de un color rojo después de agregar el reactivo de Kovacs indica una prueba positiva para indol y el desarrollo de turbidez hacia los lados de la estría de inoculación indica motilidad positiva. (Sahm & Weissfeld, 2009, p. 244)

2.6.4.6 Citrato

En un tubo con agar citrato de Simmons se sembró por estría un inóculo de la colonia bacteriana y se dejó a 37° C por 24 horas. El indicador de pH es el azul de bromotimol el cual en presencia de alcalinidad vira al color azul indicando que la prueba es positiva. (Silva, et al., 2006, p. 64)

2.6.4.7 Reacción de la Ureasa

En un tubo con agar ureasa se sembró la colonia bacteriana por estría pico de flauta. Se incubó por 24 horas a 37°C. El indicador de pH es rojo de fenol, el cual en alcalinidad vira a un color violeta indicando una prueba positiva y al presentar un color amarillo la prueba será negativa. (Bailón, et al., 2003, p. 69)

2.6.4.8 Hidrólisis de Almidón

Se inoculó la colonia bacteriana realizando una estría sobre el medio, se dejó a 37°C por 2 a 8 días. Al agregar la solución de lugol sobre la estría la presencia de un halo transparente alrededor de la colonia indica que la prueba es positiva es decir que la bacteria hidroliza el almidón mediante la amilasa. (Olivas & Alarcón, 2004, p. 35)

2.6.4.9 Hidrólisis de Gelatina

Se inoculó la colonia bacteriana realizando una estría en la superficie del medio. Se incubó a 37°C por 2 a 8 días. Un precipitado blanco tras la adición del reactivo cloruro mercurico ácido indica la presencia de gelatina no hidrolizada y la ausencia del precipitado en la región de crecimiento bacteriano indica hidrólisis de la gelatina. (Bailón, et al., 2003, p. 48)

2.6.4.10 Esquemas del Estudio Microbiológico con cada una de las Identificaciones de las Bacterias encontradas en el Balneario Rumiloma



Figura 23-2. Esquema General del Análisis Microbiológico
Realizado por: JACHO, Katy, 2015

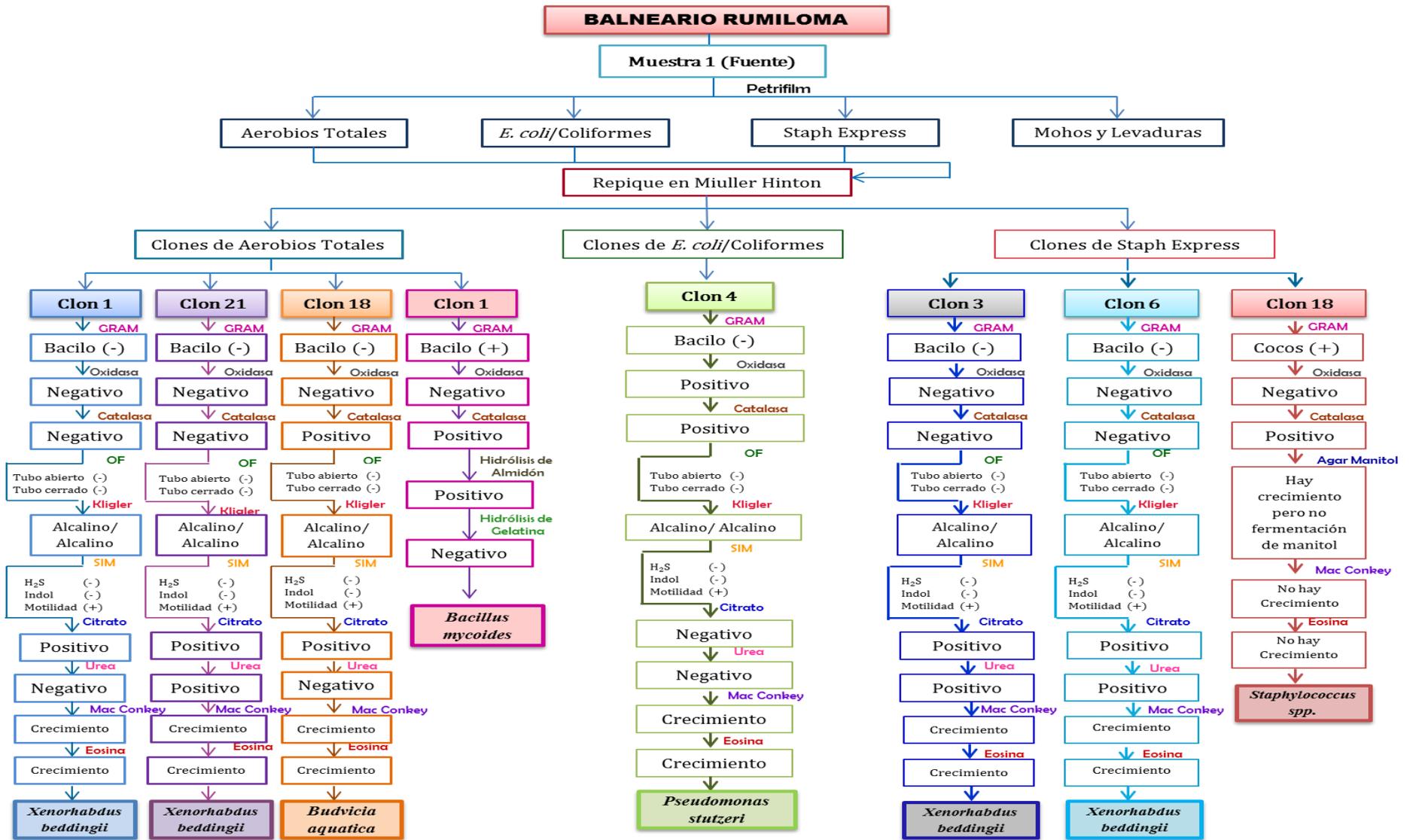


Figura 24-2. Esquema General de Identificación de Bacterias Aisladas en el ojo de agua
Realizado por: JACHO, Katy, 2015

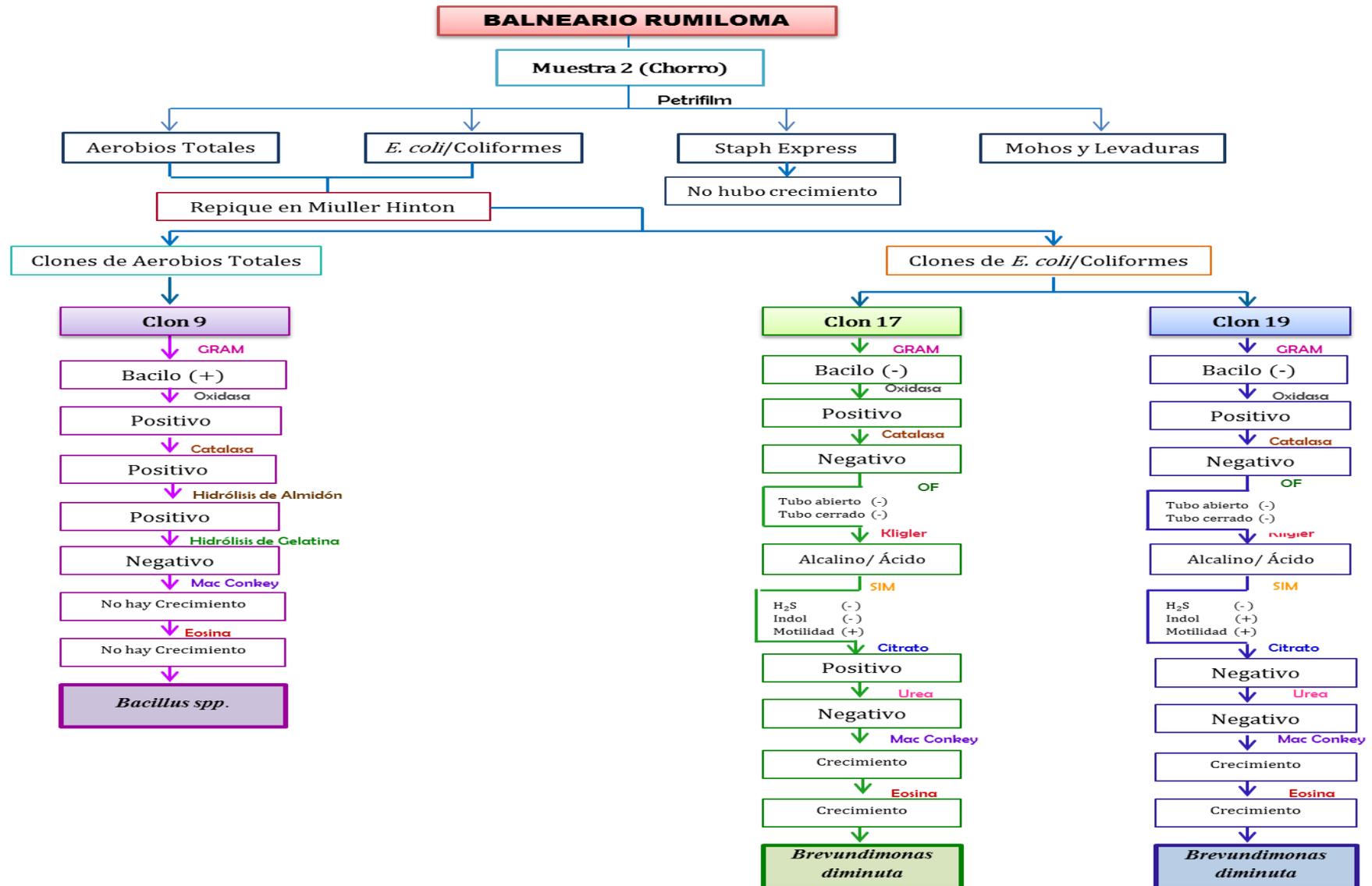


Figura 25-2. Esquema General de Identificación de Bacterias Aisladas en el chorro de agua
Realizado por: JACHO, Katy, 2015

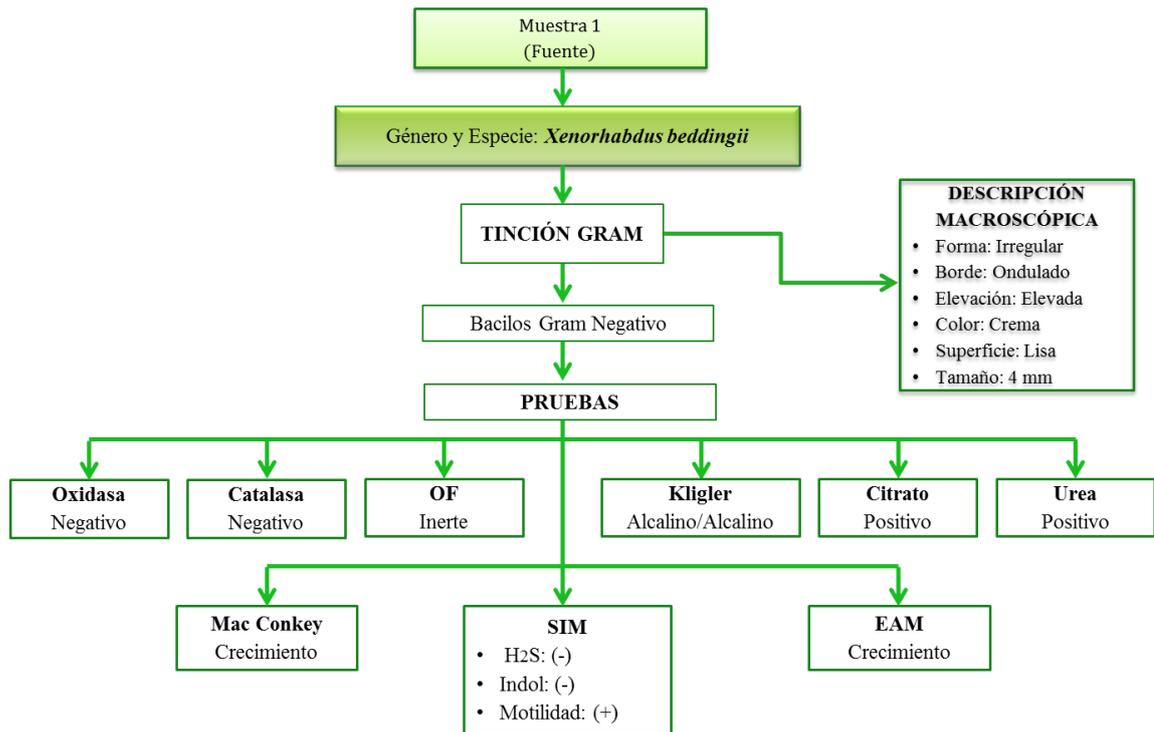


Figura 26-2. Esquema de Identificación de *Xenorhabdus beddingii*
Realizado por: JACHO, Katy, 2015

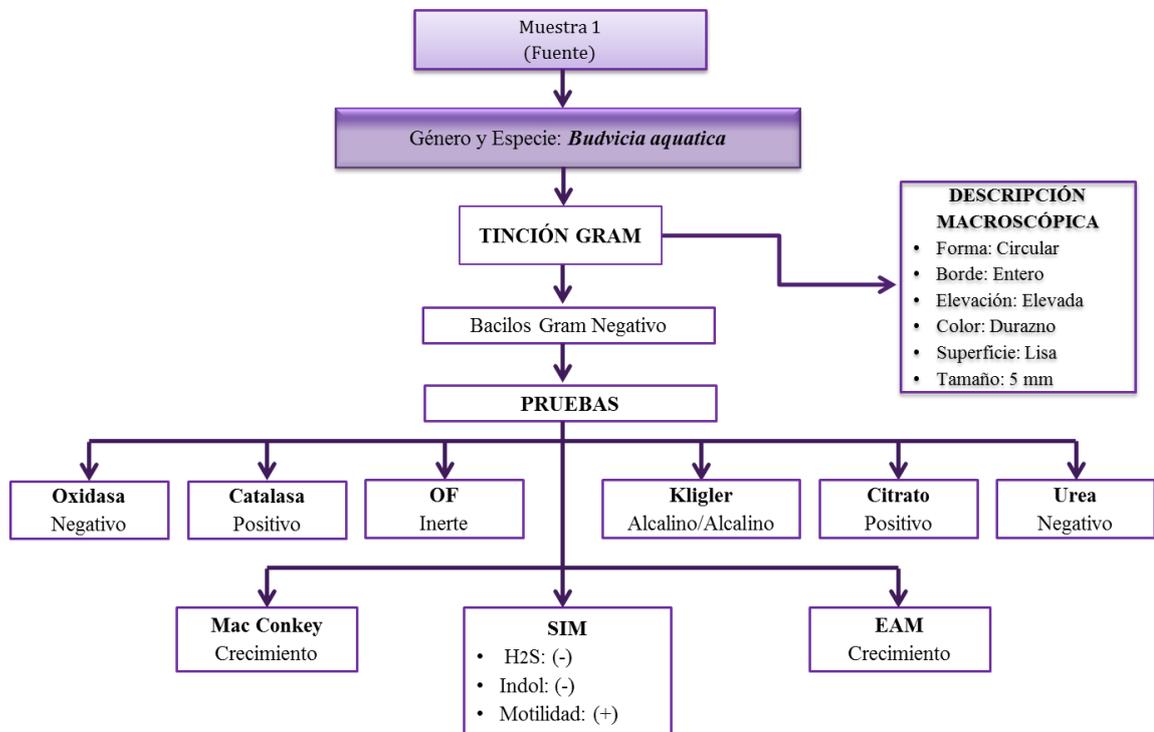


Figura 27-2. Esquema de Identificación de *Budvicia aquatica*
Realizado por: JACHO, Katy, 2015

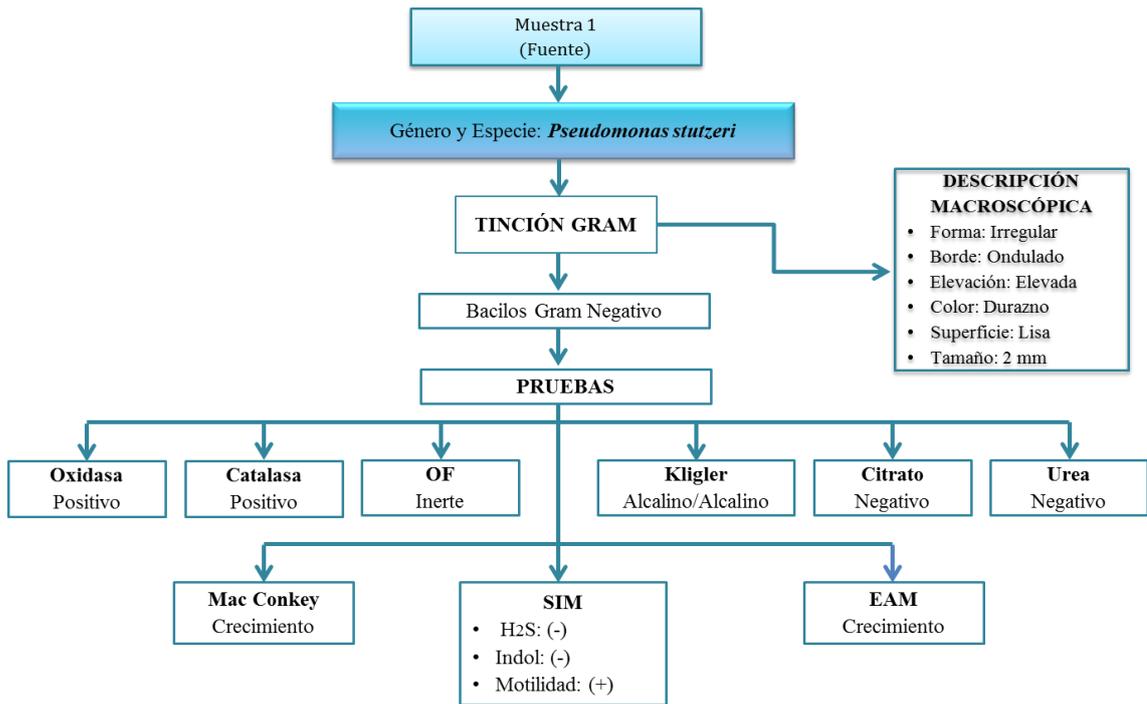


Figura 28-2. Esquema de Identificación de *Pseudomonas stutzeri*
Realizado por: JACHO, Katy, 2015

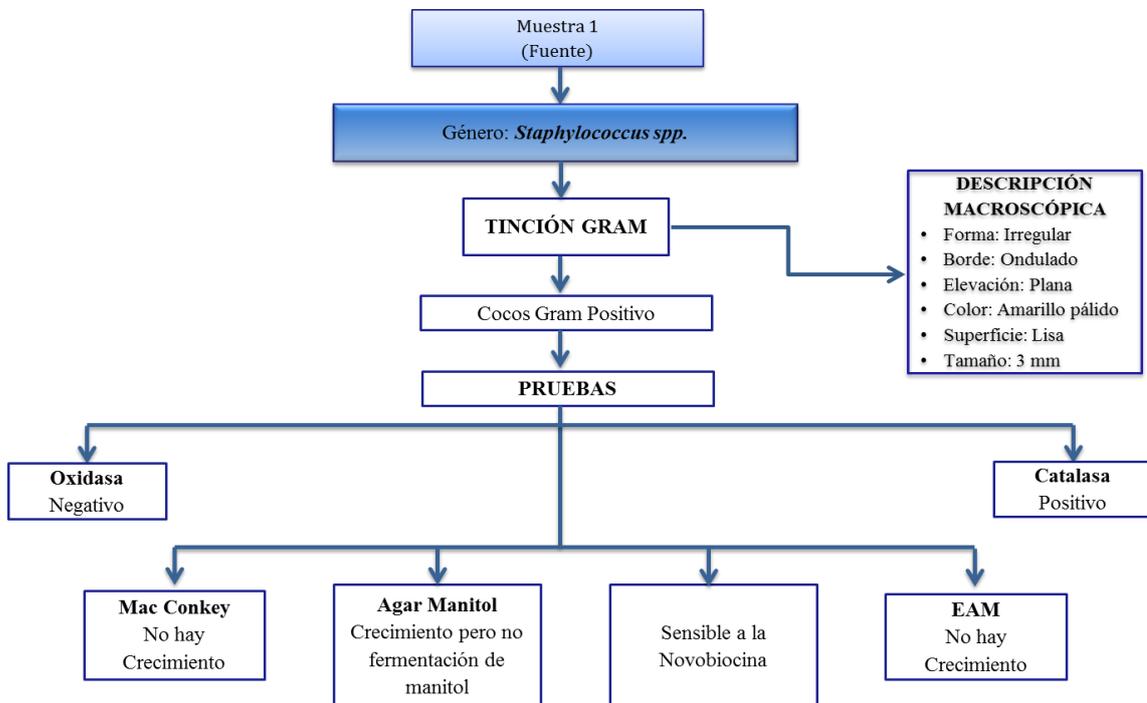


Figura 29-2. Esquema de Identificación de *Staphylococcus spp.*
Realizado por: JACHO, Katy, 2015

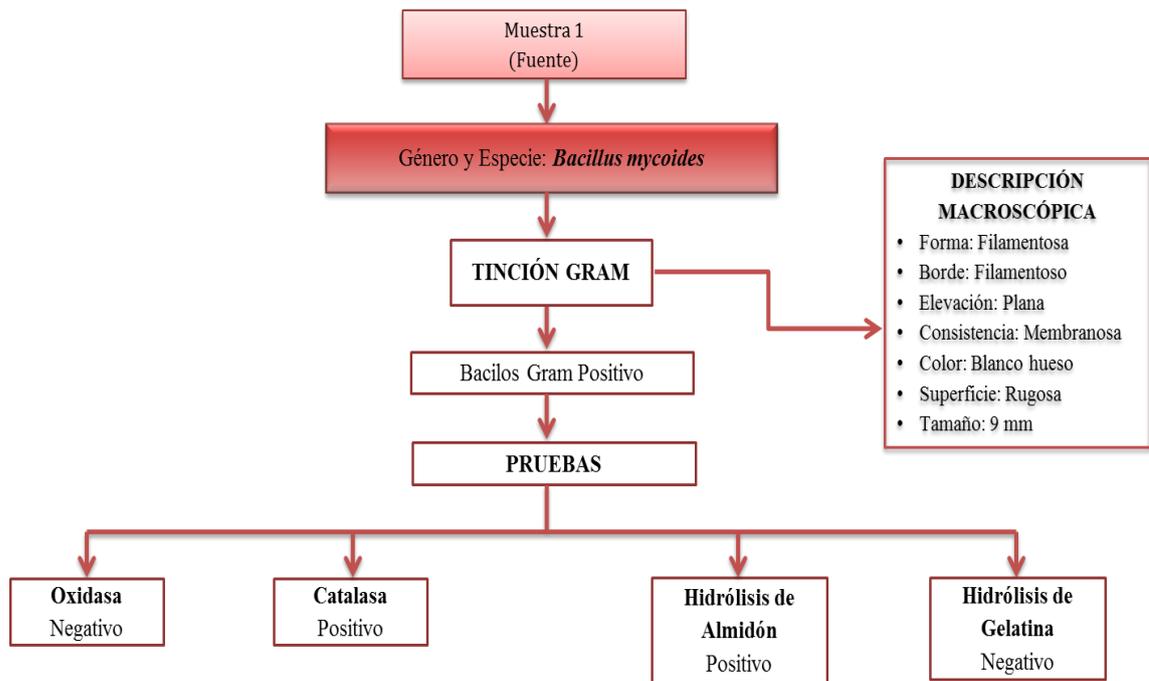


Figura 30-2. Esquema de Identificación de *Bacillus mycoides*
 Realizado por: JACHO, Katy, 2015

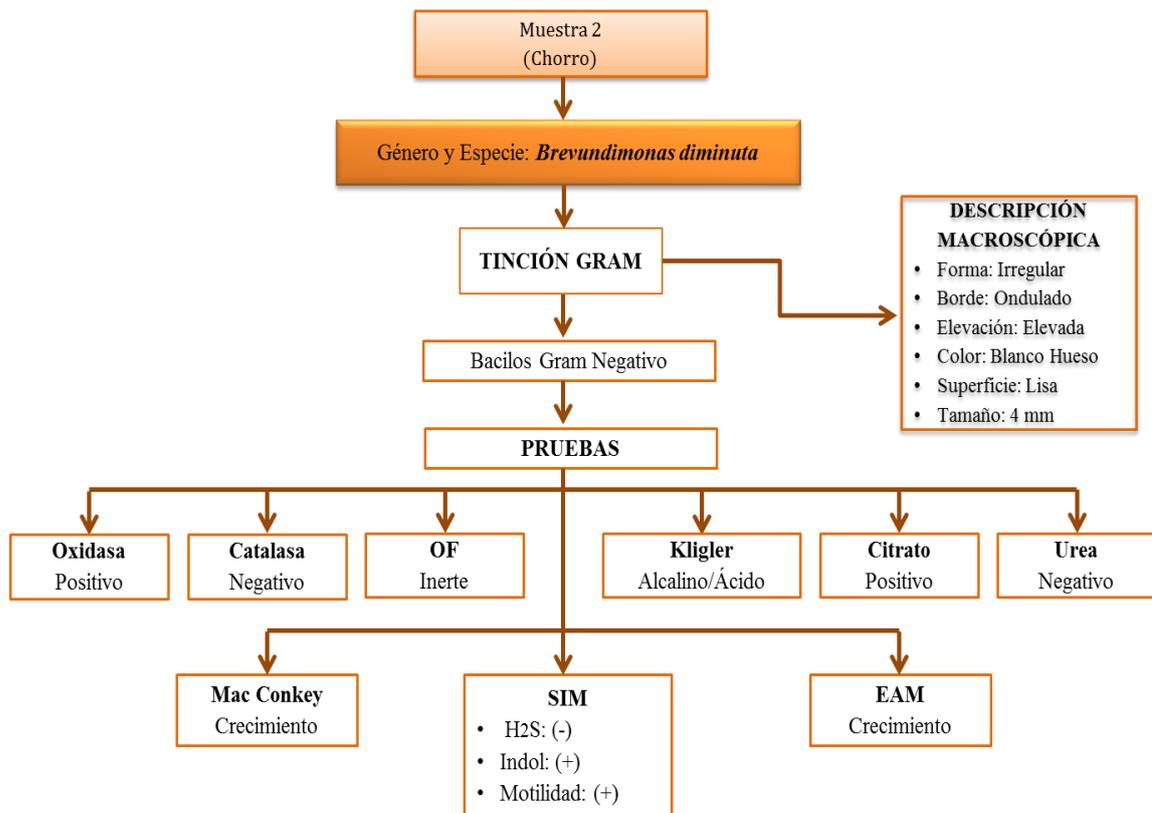


Figura 31-2. Esquema de Identificación de *Brevundimonas diminuta*
 Realizado por: JACHO, Katy, 2015

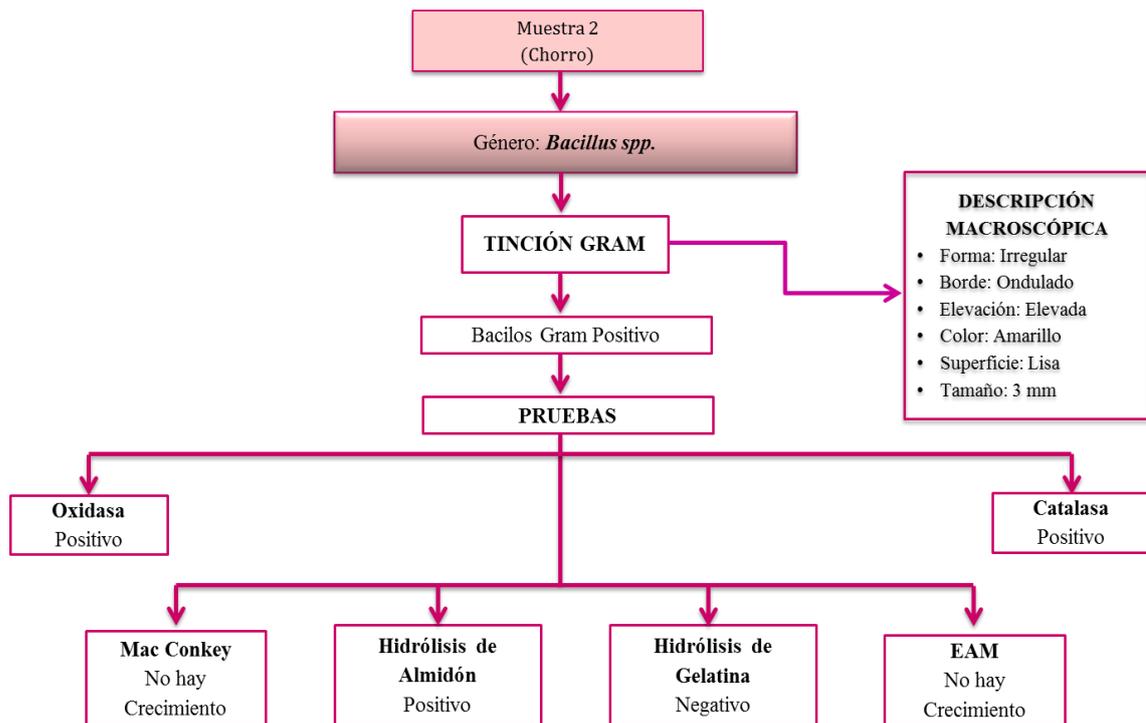


Figura 32-2. Esquema de Identificación de *Bacillus* spp.
Realizado por: JACHO, Katy, 2015

2.6.5 Identificación de colonias bacterianas puras por galerías MICROGEN™ GN-ID

Para la identificación de colonias puras mediante galerías MICROGEN™ GN-ID se realizó principalmente la prueba de oxidasa ya que en caso de ser oxidasa positiva se utiliza las tiras GN A y GN B y en caso de oxidasa negativa la tira GN A.

Para las tiras GN A y GN B se tomó una colonia pura de 24 horas de incubación y se mezcló bien en 5 mL de solución salina estéril 0.85%. Posteriormente se retiró cuidadosamente la lámina adhesiva que sella a los pocillos de la tira y con una pipeta estéril se añadió 100 µL de la suspensión bacteriana a cada pocillo. Después de la inoculación se colocó 3-4 gotas de aceite mineral en los pocillos marcados con un círculo negro 1,2 y 3 de la tira GN A y pocillo 24 de la tira GN B, se selló la parte superior de la tira con la lámina adhesiva que fue retirada anteriormente. Se incubó las tiras a 35°C por 48 horas. Finalmente se dio lectura a las tiras.

2.6.6 Prueba de sensibilidad antimicrobiana

Para la determinación del antibiograma se utilizó el método de difusión con disco para lo cual se tomó una colonia pura de 24 horas de incubación, se ajustó la turbidez del inóculo con solución salina hasta una concentración de 0,5 de la escala de MacFarland mediante una comparación

visual con el estándar. Posteriormente se sembró en placas de Mueller-Hinton con la ayuda de un hisopo estéril inoculando toda la placa en tres dimensiones distribuyendo completamente al inóculo. Se colocaron los discos con ayuda de una pinza estéril en la superficie inoculada realizando cierta presión para asegurarse que los discos se compacten con la superficie del agar, los discos fueron colocados a una distancia no menor de 24 mm desde un centro al otro. Las placas se incubaron de forma invertida a 35°C por 24 horas. Después del tiempo de incubación se examinó las placas. Para reportar los resultados el criterio que se utilizó fue la presencia de un halo como sensibilidad y la ausencia de halo como resistencia. (Zaragoza, et al., 2008, p. 57)

2.6.7 Prueba fenotípica para la determinación de Metallo β -Lactamasas

Se tomó una colonia pura de 24 horas de incubación, se ajustó la turbidez del inóculo con solución salina hasta una concentración de 0,5 de la escala de MacFarland. En placas de Mueller-Hinton se sembró con un hisopo estéril inoculando toda la placa en tres dimensiones. Se colocó un disco de Imipenem y Meropenem, en el centro de los dos discos se ubicó un disco de papel de filtro estéril conteniendo 10 μ L de EDTA 0,5 M. Se incubó a 35°C por 24 horas y luego de la incubación se realizó la lectura de la prueba. (Navajas, 2013, p. 27)

CAPÍTULO III

3. MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los resultados que se muestran en las siguientes tablas pertenecen a los valores conseguidos en las diferentes determinaciones microbiológicas realizadas tanto en la fuente como en el chorro de agua del Balneario Rumiloma de la parroquia Guangopolo provincia de Pichincha.

3.1 Parámetros In Situ

Tabla 3-3. Determinación de parámetros in situ del Manantial Termal del Balneario “Rumiloma”.

PARÁMETROS IN SITU	SITIO		PROMEDIO
	Fuente	Chorro	
Temperatura (°C)	31	30	30,5
Temperatura Ambiente (°C)	22	22	22
pH	8,0	8,0	8,0
Conductividad (μS/cm)	983	998	990,5
Sólidos Totales Disueltos (ppm)	492	493	492,5

Realizado por: JACHO, K., 2015

En la Tabla 3-3 se muestra los valores de cada uno de los parámetros in situ realizados presentando una temperatura promedio del balneario de 30,5°C y una temperatura promedio ambiente de 22°C lo que demuestra que la temperatura promedio del balneario es 8,5°C superior a la temperatura ambiente por lo cual es considerada como agua termal.

La INAMHI en el año 2013 realizó una investigación sobre Aguas termominerales en el Ecuador reportando que el balneario Rumiloma presenta una temperatura de 31,5°C lo cual indica que la diferencia es mínima con la temperatura obtenida en el estudio realizado.

Flores, (2013, pp. 74) estudió las Aguas del Manantial Termal Santa Apolonia del Estado de Mérida cuya temperatura promedio del afluente termal de Santa Apolonia fue de 35°C y la temperatura promedio ambiental fue de 25,5°C siendo considerada agua termal.

En nuestro estudio para clasificar a las aguas mineromedicinales de acuerdo a su temperatura se lo ha hecho según la INAMHI (2013) la cual considera agua termal aquella cuya temperatura se encuentra entre 30 y 40°C, es así que la temperatura promedio del balneario en estudio es de 30,5°C lo que hace que se la denomine como termal. Autores como Cáseres et al., Maraver y Armijo et al en el Vademécum de Aguas Mineromedicinales Españolas (2003) clasifican a las aguas mineromedicinales según su temperatura inferior a 35°C como hipotermales. (Francés, et al., 2011, p. 43)

El valor de pH obtenido es de 8 lo que indica que las aguas del balneario Rumiloma son alcalinas, valor que concuerda con el INAMHI (2013) el cual reporta un pH de 8,1.

En los manantiales las diferencias de los valores de pH puede deberse a la composición química de cada manantial. En los balnearios Albacete, Alicún de las Torres, Valdelateja y de Jaraba presentan valores de pH entre 7,5-7,9, valores no tan dispersos en comparación al valor de pH del balneario en estudio.

El pH afecta al crecimiento microbiano ya que cada microorganismo posee un intervalo definido de pH para su desarrollo, siendo así que la mayoría de las bacterias suelen crecer entre pH 5,5-8 por lo que en el balneario Rumiloma puede encontrarse una variedad de microorganismos. (Flores, 2013, p. 74)

En cuanto a los sólidos disueltos y a la conductividad eléctrica los valores obtenidos fueron (492,5 ppm y 990,5 μ S/cm), al comparar estos valores con un estudio reportado por el INAMHI en el 2013, se observa que existen diferencias muy pequeñas que pueden deberse a variaciones estacionales normales en el agua o a diferencias en los equipos de medición.

3.2 Recuento de bacterias Aerobias Mesófilas

El conteo de bacterias aerobias mesófilas se realizó por el método de Petrifilm, para lo cual se sembraron las muestras de la fuente y del chorro, y tras incubar a 35°C por 48 horas se obtuvieron los siguientes resultados (Tabla 4-3).

Tabla 4-3. Recuento de bacterias Aerobias Mesófilas (UFC/mL) del Manantial Termal del Balneario “Rumiloma”.

SITIO		NÚMERO DE UFC/mL	MEDIA (\bar{x}) UFC/mL	VARIANZA	DESVIACIÓN ESTÁNDAR (Ds)
Fuente	Muestra 1	$2,0 \times 10^3$	$2,0 \times 10^3$	1302853,667	1141,426155
	Muestra 2	$2,0 \times 10^3$			
Chorro	Muestra 1	$2,7 \times 10^1$	$2,3 \times 10^1$		
	Muestra 2	$1,9 \times 10^1$			
PROMEDIO BALNEARIO			$1,01 \times 10^3$		

Realizado por: JACHO, K., 2015

En la Tabla 4-3 y Gráfico 1-3 se expresa el número de bacterias aerobias mesófilas tanto de la fuente como del chorro de agua, notándose que en la fuente existe un mayor número de bacterias aerobias mesófilas de $2,0 \times 10^3$ UFC/mL representando un 97,73% del total de bacterias existentes en el balneario siendo superior al número de aerobios mesófilos del chorro de agua que es de $2,3 \times 10^1$ UFC/mL representando solo 2,27% de aerobios mesófilos del balneario.

El número alto de bacterias aerobias mesófilas en la fuente puede deberse a la infraestructura del sitio como a la presencia de insectos que tienen libre acceso. En tanto la razón por la que el chorro de agua presente un número mucho menor al de la fuente puede deberse a que al agua que sale de la fuente se le coloca una cierta cantidad de cloro (hipoclorito de sodio) el cual es una sustancia bactericida que va a inhibir el crecimiento de las bacterias.

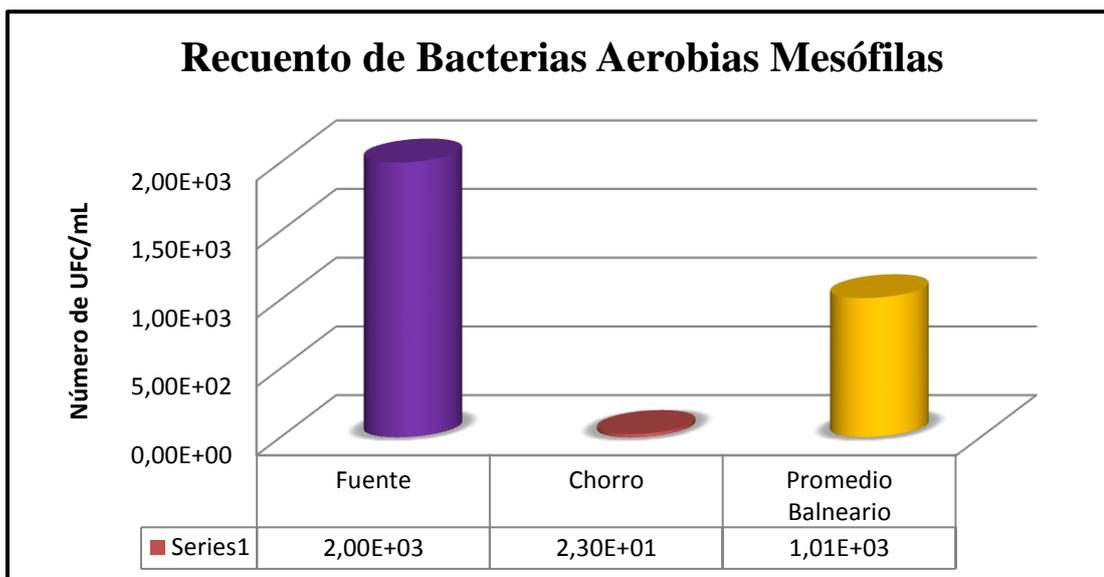


Gráfico 1-3. Recuento de bacterias Aerobias Mesófilas (UFC/mL) del Manantial Termal del Balneario “Rumiloma”

Realizado por: JACHO, K., 2015

Torija., et al. (2006) en el Balneario Cervantes y Francés., et al. (2009) en el Balneario de Alicún de las Torres tras un análisis microbiológico reportaron que el número de bacterias heterótrofas y oligotróficas aerobias viables en cada uno de los balnearios antes mencionados ha sido inferior a 100 UFC/mL y el de esporuladas inferior a 5 UFC/mL, mostrando que la protección de los manantiales es apropiada. El valor de bacterias aerobias mesófilas es equivalente con el del chorro de agua del Balneario “Rumiloma” el cual es de $2,3 \times 10^1$ UFC/mL.

Francés., et al. (2011) hicieron un estudio microbiológico del Balneario de Baños de la Concepción de Villatoya obteniendo como resultado en el punto de emergencia de los tres manantiales un valor menor a 20 UFC/mL de bacterias heterótrofas y oligotrofas aerobias viables. Estos valores son inferiores a los obtenidos en el Balneario “Rumiloma”.

3.3 Recuento de bacterias de Coliformes Totales y Fecales

El conteo de bacterias coliformes totales y fecales se realizó por el método de Petrifilm, para lo cual se sembraron las muestras de la fuente y del chorro, obteniéndose los resultados que se muestran a continuación (Tabla 5-3).

Tabla 5-3. Recuento de bacterias de Coliformes Totales y Fecales (UFC/mL) del Manantial Termal del Balneario “Rumiloma”.

SITIO		COLIFORMES TOTALES (CT)	COLIFORMES FECALES (CF)	MEDIA (\bar{x}) (CT) UFC/mL	MEDIA (\bar{x}) (CF) UFC/mL	VARIANZA	DESVIACIÓN ESTÁNDAR (Ds)
Fuente	Muestra 1	7,4x10 ¹	2,0	8,6x10 ¹	1,0	2338	48,352869
	Muestra 2	9,8x10 ¹	0,0				
Chorro	Muestra 1	5,0	0,0	4,0	0,0		
	Muestra 2	3,0	0,0				
PROMEDIO BALNEARIO				4,5x10¹	5,0x10⁻¹		

Realizado por: JACHO, K., 2015

En la Tabla 5-3 y Gráfico 2-3 se muestra el número de coliformes totales y fecales encontrados tanto en la fuente como en el chorro de agua, 8,6x10¹ UFC/mL de coliformes totales y de 1,0 UFC/mL de coliformes fecales (*Escherichia coli*) en la fuente, mientras que en el chorro de agua 4,0 UFC/mL de coliformes totales y ausencia de coliformes fecales lo cual indica una clara diferencia entre ambos sitios de muestreo.

El bajo número de coliformes totales y la ausencia de coliformes fecales en el chorro de agua puede deberse a una cierta cantidad de cloro que se coloca en el agua lo que hace que la carga microbiana disminuya.

La presencia de coliformes totales en el Balneario “Rumiloma” no indica un riesgo sanitario debido a que pueden surgir del suelo y sobrevivir en ambientes acuáticos por su facilidad de adaptación.

Hood., et al. (1983) considera que los niveles bajos de coliformes de origen fecal son buenos indicadores de ausencia de organismos patógenos, es así que el número promedio de coliformes

fecales (*Escherichia coli*) en el Balneario “Rumiloma” es $5,0 \times 10^{-1}$ UFC/mL siendo un valor bajo lo cual no constituye un riesgo de contaminación para los bañistas.

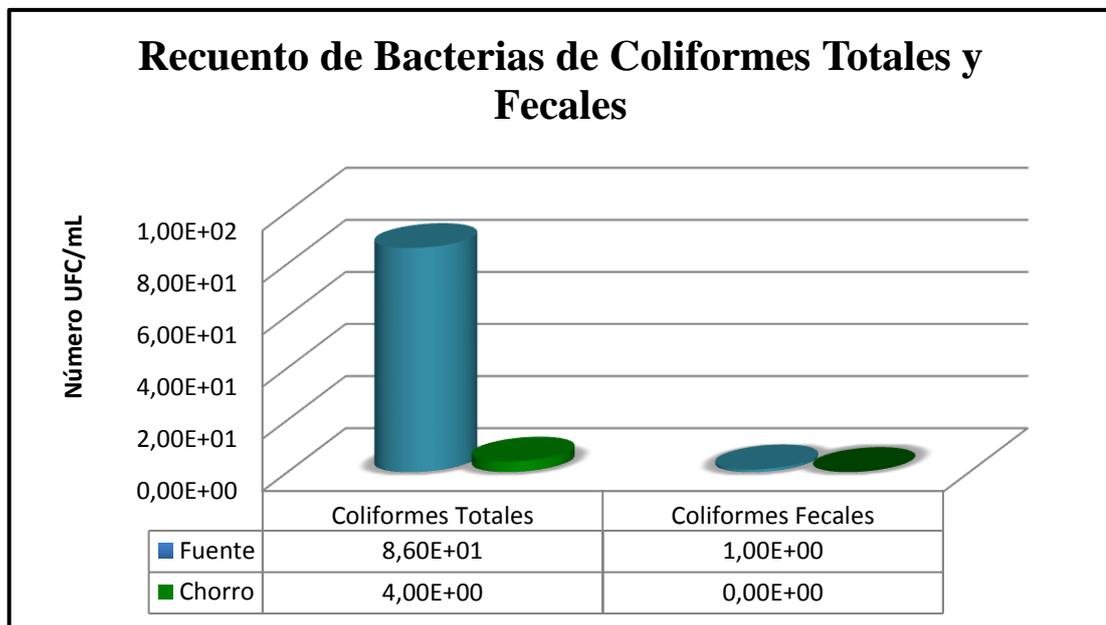


Gráfico 2-3. Recuento de bacterias de Coliformes Totales y Fecales (UFC/mL) del Manantial Termal del Balneario “Rumiloma”

Realizado por: JACHO, K., 2015

Mosso., et al. (2006) investigaron la microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario Cervantes reportando que en los puntos de muestreo realizados no se hallaron indicadores fecales (*Escherichia coli*, enterococos y *Clostridium perfringens*) pero si se encontraron coliformes totales en número muy bajo, menos de 10/100 mL de agua.

Los valores obtenidos de UFC de coliformes totales en la fuente y en el chorro de agua del Balneario en estudio son superiores en comparación a los del Balneario Cervantes cuya presencia no se considera indicadora de contaminación ya que pueden proceder del suelo.

De La Rosa., et al. (2007) Balneario Puente Viesgo, De La Rosa., et al. (2009) Balneario Alicún de las Torres y Mosso & De La Rosa (2011) Balneario de Baños de la Concepción realizaron un estudio microbiológico de cada uno de los balnearios antes mencionados reportando la ausencia de microorganismos indicadores de contaminación fecal (*Escherichia coli*, enterococos, *Clostridium* sulfito-reductores y *Clostridium perfringens*) cumpliendo las muestras con la normativa de aguas de consumo humano. Estos resultados concuerdan con los del chorro de agua del Balneario “Rumiloma” por no presentar indicadores de contaminación fecal (*Escherichia coli*) lo que muestra que estas aguas no son un riesgo para la salud de los usuarios.

3.4 Recuento de Staph Express (*Staphylococcus aureus*)

La estimación del número de bacterias del género *Staphylococcus* se lo realizó por el método de Petrifilm, usando las placas Staph express, para lo cual se sembró las muestras de la fuente y del chorro, tras incubar a 35°C por 48 horas se obtuvieron los siguientes resultados (Tabla 6-3).

Tabla 6-3. Recuento de bacterias del género *Staphylococcus* (UFC/mL) del Manantial Termal del Balneario “Rumiloma”.

SITIO	NÚMERO DE UFC/mL	MEDIA (\bar{x}) UFC/mL	VARIANZA	DESVIACIÓN ESTÁNDAR (Ds)
Fuente	Muestra 1	1,0x10 ¹	44	6,633249581
	Muestra 2			
Chorro	Muestra 1	0,0	44	6,633249581
	Muestra 2			
PROMEDIO BALNEARIO		5,0		

Realizado por: JACHO, K., 2015

En la Tabla 6-3 y Gráfico 3-3 se aprecia el recuento de bacterias del género *Staphylococcus* observándose que en la fuente existe un mayor número de bacterias del género *Staphylococcus* de 1,0 x10¹ UFC/mL representando el 100% del total del promedio del balneario debido a que en el chorro de agua no hubo presencia de bacterias de dicho género.

La razón por la se encontraron mayor número de bacterias del género *Staphylococcus* en la fuente puede deberse a que se encuentran en el ambiente las cuales pueden ser llevadas a través del aire, el suelo y la lluvia, así como también por el personal que tiene acceso al sitio y como se conoce que los *Staphylococcus* son miembros típicos de la microflora habitual de la piel a más de tener gran resistencia a condiciones medioambientales.

En el caso del chorro de agua la ausencia de bacterias del género *Staphylococcus* puede ser al proceso de limpieza y desinfección que se le da al agua que sale de la fuente mediante la adición de cloro el cual se disocia al estar en contacto con el agua produciendo ácido hipocloroso el cual va a destruir a las bacterias presentes. (Castro & Chaidés, 2003, p. 18)

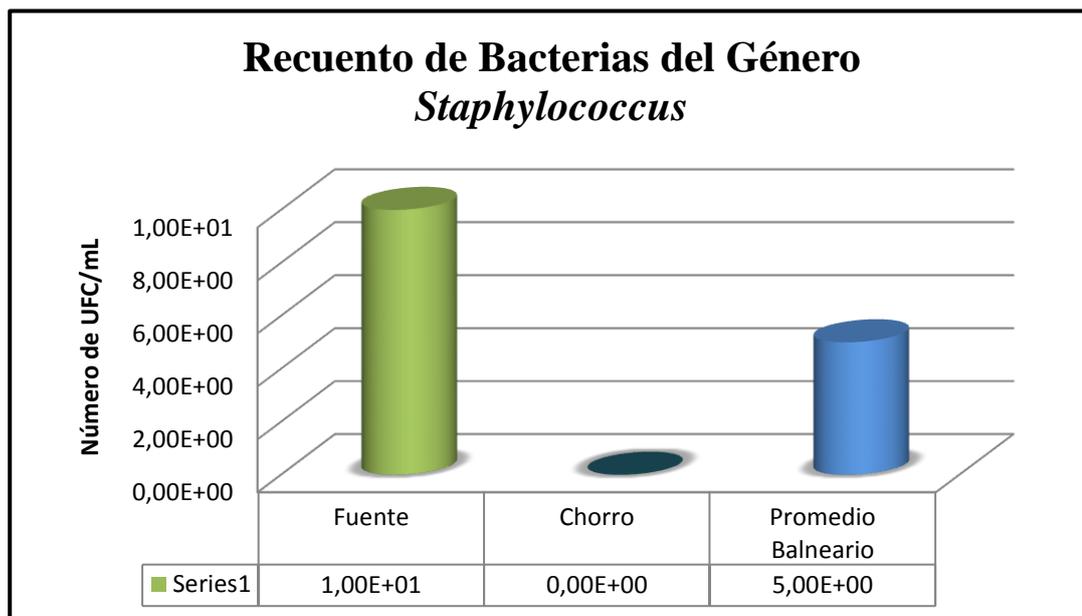


Gráfico 3-3. Recuento de bacterias del género *Staphylococcus* (UFC/mL) del Manantial Termal del Balneario “Rumiloma”.

Realizado por: JACHO, K., 2015

De La Rosa., et al. en el 2007 analizaron las aguas del manantial mineromedicinal del Balneario Puente Viesgo reportando la ausencia de bacterias patógenas (*Staphylococcus aureus*) y la presencia de bacterias del género *Staphylococcus* en baja proporción (10,8%), valores que concuerdan con los obtenidos por nosotros en este estudio por la ausencia de *Staphylococcus aureus* en ambos puntos de muestreo.

En el año 2009 De La Rosa., et al. realizaron estudios de microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario Alicún de las Torres en el cual no se encontró presencia de bacterias patógenas (*Staphylococcus aureus*) en 250 mL de agua. Al comparar con los resultados obtenidos en este trabajo concuerda debido a la ausencia de *Staphylococcus aureus* en la fuente como en el chorro de agua.

Mosso & De La Rosa en el año 2011 en los manantiales mineromedicinales del Balneario de Baños de la Concepción de Villatoya (Albacete) realizaron un análisis microbiológico reportando la ausencia de *Staphylococcus aureus*, bacteria que puede transmitirse a través del agua de las vías más frecuentes de aplicación como oral, respiratoria o tópica.

El *Staphylococcus aureus* suele encontrarse como flora normal en la nariz de portadores que pueden introducirlo en el agua o a través de personas que se bañen teniendo alguna lesión en la piel causada por dicha bacteria. (Gestión de Aguas y Residuos, sf, p. 36)

3.5 Recuento de Mohos y Levaduras

El conteo de mohos y levaduras se realizó por el método de Petrifilm, para lo cual se sembraron las muestras de la fuente y del chorro, obteniéndose los resultados que se muestran a continuación (Tabla 7-3).

Tabla 7-3. Recuento de Mohos y Levaduras (UFC/mL) del Manantial Termal del Balneario “Rumiloma”.

SITIO		MOHOS (M)	LEVADURAS (L)	MEDIA (\bar{X}) (M)	MEDIA (\bar{X}) (L)	VARIANZA	DESVIACIÓN ESTÁNDAR (Ds)
Fuente	Muestra 1	4,0	4,0	3,5	5,0	4,57142857	2,138089935
	Muestra 2	3,0	6,0				
Chorro	Muestra 1	0,0	1,0	0,0	1,5		
	Muestra 2	0,0	2,0				
PROMEDIO BALNEARIO				1,75	3,25		

Realizado por: JACHO, K., 2015

En la Tabla 7-3 y Gráfico 4-3 se aprecia que en el chorro de agua existe bajo número de levaduras (1,5 UFC/mL) y ausencia de mohos, mientras que en la fuente hay un mayor número de mohos y levaduras 3,5 UFC/mL y 5,0 UFC/mL respectivamente.

Los hongos y levaduras se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, la mayoría suele proceder del suelo los cuales se aclimatan a las condiciones de ambientes acuáticos.

La presencia de mohos y levaduras no afectan a la calidad sanitaria de las aguas siempre y cuando se encuentran en un número bajo ya que al encontrarse en un gran número podría multiplicarse rápidamente y causar infecciones en los bañistas como micosis la cual puede ser profunda y cutánea. (Mosso & De La Rosa, 2011, p. 62)

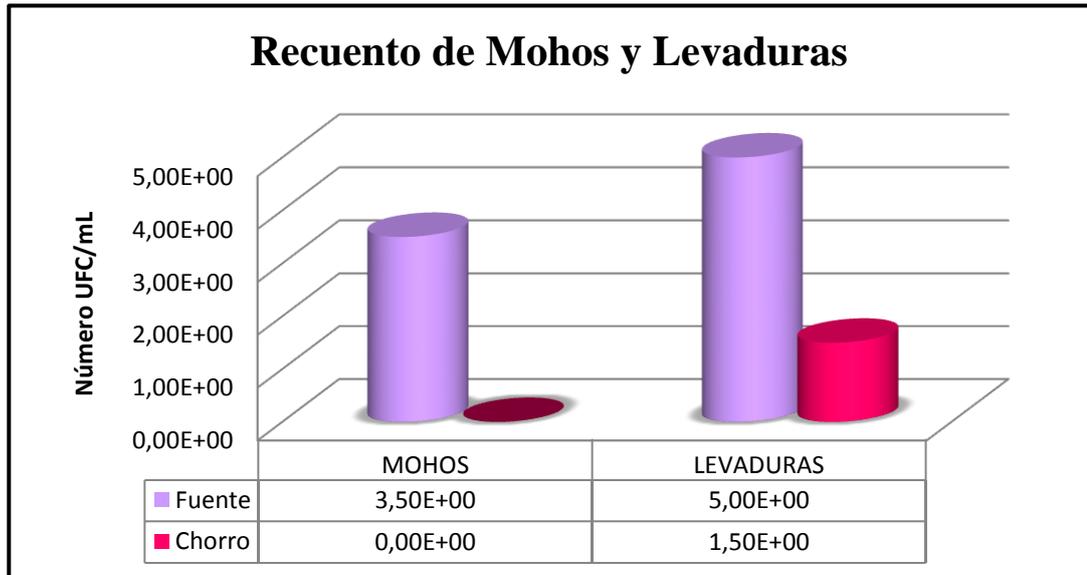


Gráfico 4-3. Recuento de Mohos y Levaduras (UFC/mL) del Manantial Termal del Balneario “Rumiloma”

Realizado por: JACHO, K., 2015

En el caso de las muestras de mohos nuestros resultados no coinciden con los reportados por De la Rosa., et al. (2004) quienes reportaron el aislamiento de hongos en un número menor a 10 UFC/mL en el Balneario de Jaraba, Mosso., et al. (2006) reportaron 20 UFC/mL en los manantiales mineromedicinales del Balneario Cervantes en el cual aislaron hongos, De La Rosa., et al. (2013) encontraron mayor número de hongos en Balneario El Raposo indicando que su presencia es poco frecuente debido a que la mayoría de hongos proceden del suelo pero que se adaptan a las condiciones de ambientes acuáticos, siendo la mayoría saprofitos en el que algunos de ellos pueden ser dañinos para el ser humano llegando a producir diferentes patologías como micosis superficiales, subcutáneas y profundas.

En caso de las levaduras los resultados encontrados por nosotros coinciden con De la Rosa., et al. (2004) quienes reportaron el aislamiento de dos cepas de levaduras a partir de ambientes acuáticos

3.6 Número de Clones Aislados

En el presente trabajo se lograron aislar un total de 45 clones (Tabla 8-3) y (Gráfico 5-3) de los cuales 13 (29%) fueron bacterias Gram positivas, 27 (60%) Gram negativos y 5 (11%) que no pudieron ser separados.

Tabla 8-3. Número de clones aislados del Manantial Termal del Balneario “Rumiloma”.

SITIO	NÚMERO DE CLONES GRAM (+)	%	NÚMERO DE CLONES GRAM (-)	%	NÚMERO DE CLONES MEZCLADOS	%
Fuente	9	20%	17	38%	4	9%
Chorro	4	9%	10	22%	1	2%
TOTAL	13	29%	27	60%	5	11%

Realizado por: JACHO, K., 2015

A partir de las muestras de la fuente se aislaron un total de 30 clones de los cuales fueron 9 (20%) Gram positivos, 17 (3%) Gram negativos y 4 (9%) clones mezclados los cuales tras realizar una tinción gram y ser observados en el microscópico no pudieron ser separados.

El otro punto de muestreo fue el chorro de agua de donde se aislaron 4 (9%) clones bacterianos Gram positivos, 10 (22%) Gram negativos y uno mezclado dando un total de 15 clones aislados en dicho punto de muestreo.

Es importante indicar que en los sitios de muestreo las bacterias predominantes fueron los Gram negativos (60%).

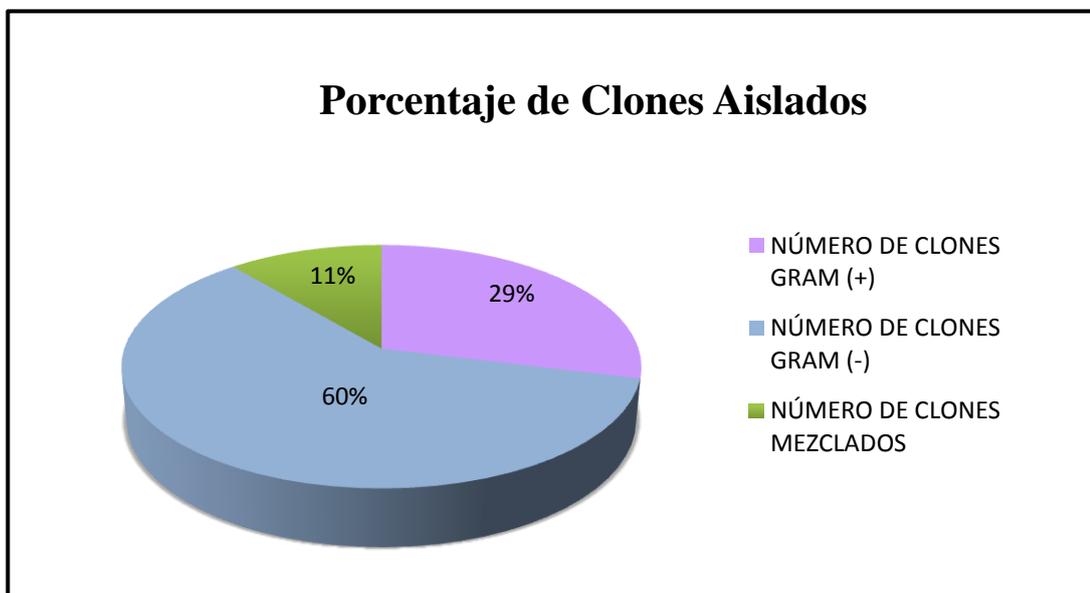


Gráfico 5-3. Porcentaje de clones aislados del Manantial Termal del Balneario “Rumiloma”
Realizado por: JACHO, K., 2015

En el caso de las bacterias Gram negativas y Gram positivas aisladas los resultados obtenidos son similares a lo reportado por De La Rosa, et al. (2004) quienes tras realizar un estudio microbiológico del Balneario de Jaraba aislaron 254 cepas de bacterias heterótrofas identificando 244 (96,1%) de las cuales corresponden a bacilos Gram negativos 165 (65%), cocos Gram positivos 44 (17,3%) y bacilos Gram positivos 35 (13,8%), predominando en estos manantiales los bacilos Gram negativos; De La Rosa, et al. en el 2007 investigaron al Balneario Puente Viesgo (Cantabria) mediante un estudio microbiológico, aislando 37 cepas de bacterias heterótrofas que compete a tipos morfológicos de bacilos Gram negativos (62,2%), bacilos y cocos Gram positivos (18,9%); Mosso, et al. en el 2008 en el Balneario Valdelateja aislaron 114 cepas de bacterias viables heterótrofas y oligotrofas, identificando un 83,3% de los cuales corresponden a los tipos morfológicos de bacilos Gram negativos fermentadores (45,6%) y no fermentadores (31,6%), bacilos y cocos Gram positivos (22,8%). Al comparar los resultados obtenidos en los diferentes estudios de los Balnearios de España (Mosso; De la Rosa), con lo encontrado por nosotros en el Balneario “Rumiloma” coinciden los resultados con los de nuestro estudio en que existe un predominio de bacilos Gram negativos.

3.7 Número y Tipos de Cepas Aisladas Seleccionadas

Del total de los 45 clones aislados se escogieron 11 clones de acuerdo al tamaño, color y forma (Tabla 9-3).

Tabla 9-3. Número y Tipos de cepas aisladas seleccionadas del Manantial Termal del Balneario “Rumiloma”.

SITIO	NÚMERO DE BACTERIAS GRAM (+) AISLADAS		NÚMERO DE BACTERIAS GRAM (-) AISLADAS
	Bacilos	Cocos	Bacilos
Fuente	1	1	6
Chorro	1	0	2
TOTAL	3		8

Realizado por: JACHO, K., 2015

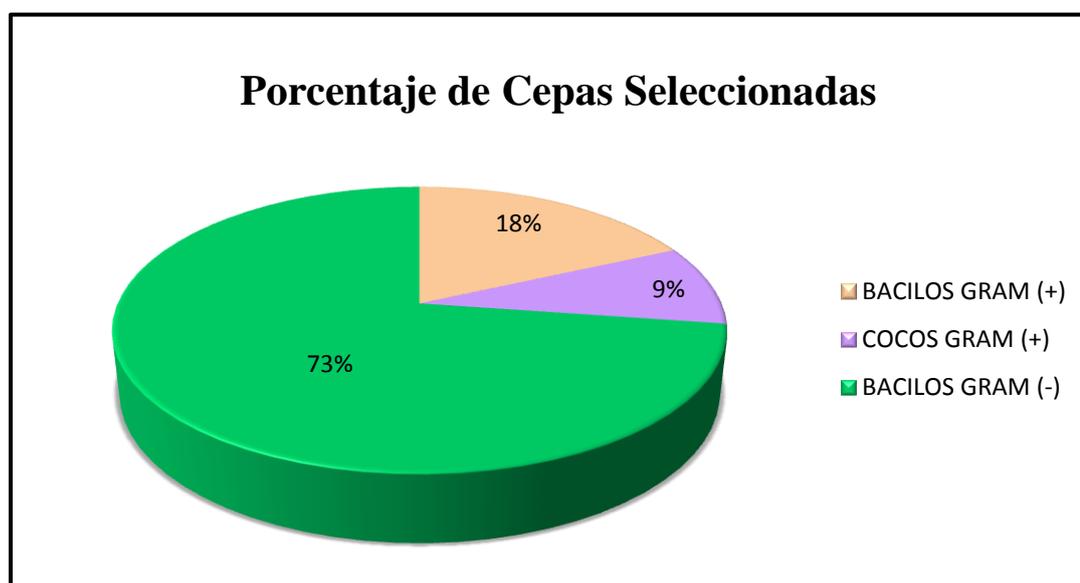


Gráfico 6-3. Porcentaje de cepas aisladas seleccionadas del Manantial Termal del Balneario “Rumiloma”.

Realizado por: JACHO, K., 2015

De los 11 clones seleccionados según la morfología bacteriana pertenecen en un alto porcentaje a bacterias Gram negativas (73%), seguido de bacilos Gram positivos (18%) y cocos Gram positivos (9%).

En el caso de las bacterias Gram negativas y Gram positivas aisladas los resultados obtenidos son diferentes a lo reportado por Mosso, Sánchez y De La Rosa (2002) quienes mediante un análisis microbiológico en aguas mineromedicinales del Balneario de Alhama de Granada aislaron e identificaron 53 cepas de bacterias heterótrofas que pertenecen a bacilos Gram positivos (49,1%), cocos Gram positivos (30,2%) y bacilos Gram negativos (20,7%), ya que en los manantiales hipertermales predominan las bacterias Gram positivas por tener mayor resistencia a la temperatura y a la concentración de sales.

Mosso, et al. en el 2006, al igual que lo reportado por nosotros en el Balneario “Rumiloma” encontró un predominio de bacilos Gram negativos característico de aguas termales en el Balneario Cervantes; De La Rosa, et al. (2009) realizaron un estudio de Microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario de Alicún de las Torres y reportaron el aislamiento de 60 cepas de bacterias viables heterótrofas y oligotrofas que corresponden a bacilos Gram negativos (54,5%), bacilos Gram positivos (29,1%) y cocos Gram positivos (16,4%); De La Rosa, et al. (2013) en el Balneario El Raposo realizaron un estudio de la microbiota de los manantiales mineromedicinales y reportaron el aislamiento de 115 cepas de bacterias viables heterótrofas y oligotrofas, que corresponden a bacilos Gram negativos (73 %), bacilos Gram positivos (23,5 %) y cocos Gram positivos (3,5 %). Al comparar los resultados obtenidos en los diferentes estudios de los Balnearios de España con lo encontrado por nosotros en el Balneario “Rumiloma”, se observa que los resultados coinciden con los de nuestro estudio en que existe un predominio de bacilos Gram negativos.

3.8 Identificación de Bacterias Gram Negativas

De los 11 clones seleccionados 8 fueron bacterias Gram negativas a las cuales se les realizó pruebas bioquímicas y la descripción de las características macroscópicas (Tabla 10-3).

Tabla 10-3. Origen, Morfología y Pruebas bioquímicas de bacilos Gram negativos aislados del Manantial Termal del Balneario “Rumiloma”.

NÚMERO DE CLON		1	3	4	6	17	18	19	21
ORIGEN	Petrifilm	Aerobios totales	Staph Express	<i>E. coli/</i> coliformes	Staph Express	<i>E. coli/</i> coliformes	Aerobios totales	<i>E. coli/</i> coliformes	Aerobios totales
	Punto de muestreo	Fuente	Fuente	Fuente	Fuente	Chorro	Fuente	Chorro	Fuente
MORFOLOGÍA	Forma	Circular	Irregular	Irregular	Irregular	Circular	Circular	Irregular	Irregular
	Borde	Entero	Ondulado	Ondulado	Ondulado	Ondulado	Entero	Ondulado	Ondulado
	Color	Crema	Blanco Hueso	Durazno	Blanco hueso	Durazno	Durazno	Blanco hueso	Crema
	Elevación	Elevada	Plana	Elevada	Plana	Elevada	Elevada	Elevada	Elevada
	Superficie	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa
	Consistencia	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa
	Luz Transmitida	Opaca	Traslúcida	Traslúcida	Traslúcida	Traslúcida	Traslúcida	Traslúcida	Opaca
	Tamaño (mm)	4	2	2	3	5	5	4	4
Catalasa	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	

PRUEBAS	Oxidasa	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
	OF	Inerte	Inerte	Inerte	Inerte	Inerte	Inerte	Inerte	Inerte
	Kligler	Alc/Alc	Alc/Alc	Alc/Alc	Alc/Alc	Alc/Ác	Alc/Alc	Alc/Ác	Alc/Alc
	Movilidad	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
	Indol	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
	H₂S	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
	Urea	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
	Citrato	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
	Mac Conkey	Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento
	Eosina Azul de Metileno	Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento
Género y Especie	<i>Xenorhabdus beddingii</i>	<i>Xenorhabdus beddingii</i>	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	<i>Xenorhabdus beddingii</i>	<i>Brevundimonas diminuta</i>	<i>Budvicia aquatica</i>	<i>Brevundimonas diminuta</i>	<i>Xenorhabdus beddingii</i>	

Realizado por: JACHO, K., 2015

En este estudio se obtuvieron de la fuente y del chorro del Balneario “Rumiloma” un total de 45 clones bacterianos aislados, para lo cual se realizó cuatro repiques para conseguir un crecimiento de los clones los cuales fueron sembrados por agotamiento obteniendo 40 clones puros de los cuales fueron seleccionados 11 clones a los que posteriormente se los identificó.

Al realizar la tinción Gram se observó que 8 de los clones seleccionados presentaron morfología de bacilos Gram negativos las diferentes colonias obtenidas del manantial termal estudiado presentaron la mayoría un color blanco hueso y durazno, forma irregular, borde ondulado, superficie lisa, consistencia cremosa, traslúcidas y elevadas. (Tabla 10-3).

En la Tabla 11-3 se muestra las pruebas bioquímicas realizadas a los clones aislados observándose catalasa variable, oxidasa variable, móviles, O/F de la glucosa son inertes, pruebas de Kligler, SIM, urea y citrato variables, crecieron a una temperatura de 35°C en medios selectivos como Mac Conkey y Eosina azul de metileno.

Los clones 17 y 19 tienen la capacidad de fermentar la glucosa, catalasa negativo, oxidasa positivo, móviles, crecieron a una temperatura de 35°C en medios selectivos como Mac Conkey y Eosina azul de metileno y solo el clon 17 tiene la presencia de la enzima triptofanasa debido a que la prueba de indol fue positiva.

3.9 Identificación de Bacterias Gram Positivas

De los 11 clones seleccionados 3 fueron bacterias Gram positivas a las cuales se les realizó pruebas bioquímicas y la descripción de las características macroscópicas (Tabla 11-3).

Tabla 11-3. Origen, Morfología y Pruebas bioquímicas de bacilos y cocos Gram positivos aislados del Manantial Termal del Balneario “Rumiloma”.

NÚMERO DE CLON		1	9	18
ORIGEN	Petrifilm	Aerobios totales	Aerobios totales	Staph Express
	Punto de muestreo	Fuente	Chorro	Fuente
MORFOLOGÍA	Forma	Filamentosa	Irregular	Irregular
	Borde	Filamentoso	Ondulado	Ondulado
	Color	Blanco hueso	Amarillo	Amarillo pálido
	Elevación	Plana	Elevada	Plana
	Superficie	Rugosa	Lisa	Lisa
	Consistencia	Membranosa	Cremosa	Cremosa
	Luz Transmitida	Opaca	Opaca	Traslúcida
	Tamaño (mm)	9	3	3
	Tinción Gram	Bacilos (+)	Bacilos (+)	Cocos (+)
	Catalasa	Positivo	Positivo	Positivo

PRUEBAS	Oxidasa	Negativo	Positivo	Negativo
	Hidrólisis de Almidón	Positivo	Positivo	No se realizó
	Hidrólisis de Gelatina	Negativo	Negativo	No se realizó
	Mac Conkey	No hay crecimiento	No hay crecimiento	No hay crecimiento
	Eosina Azul de Metileno	No hay crecimiento	No hay crecimiento	No hay crecimiento
	Agar Manitol	No se realizó	No se realizó	Crecimiento pero no fermentación
Género y Especie		<i>Bacillus mycoides</i>	<i>Bacillus spp.</i>	<i>Staphylococcus spp.</i>

Realizado por: JACHO, K., 2015

En este estudio se obtuvieron de la fuente y del chorro del Balneario “Rumiloma” un total de 45 clones bacterianos aislados, para lo cual se realizó cuatro repiques para conseguir un crecimiento de los clones los cuales fueron sembrados por agotamiento obteniendo 40 clones puros de los cuales fueron seleccionados 11 clones a los que posteriormente se los identificó.

Al realizar la tinción Gram se observó que dos clones presentaron morfología de bacilos Gram positivos y un coco Gram positivo, las diferentes colonias obtenidas del manantial termal estudiado presentaron un color amarillo, forma irregular, borde ondulado, superficie lisa, consistencia cremosa, opacas y planas (Tabla 11-3).

En la Tabla 11-3 se muestran los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a los clones aislados (bacilos Gram positivos) observándose catalasa positiva, oxidasa variable, hidrólisis del almidón fue positiva con la formación del halo, hidrólisis de gelatina fue negativa, crecieron a una temperatura de 35°C y no hubo crecimiento en los medios Mac Conkey y Eosina azul de metileno.

Los resultados obtenidos para el clon 18 aislado cocos Gram positivo (Tabla 11-3) fue catalasa positivo, oxidasa negativo, la temperatura óptima de crecimiento fue de 35°C y se evidenció que hubo crecimiento pero no fermentación en Agar Manitol.

3.10 Especies de Bacterias Identificadas

La identificación de los clones seleccionados se realizó por métodos basados en las características macroscópicas, microscópicas, pruebas bioquímicas y galerías Microgen.

En el Gráfico 7-3, se muestra los resultados obtenidos para la identificación de los clones seleccionados, correspondiente a bacilos Gram negativos las especies de los géneros *Xenorhabdus beddingii* (37%), *Brevundimonas diminuta* (18%), *Budvicia aquatica* (9%), *Pseudomonas stutzeri* (9%), bacilos Gram positivos a la especie *Bacillus mycoides* (9%), al género *Bacillus spp.* (9%) y cocos Gram positivos se identificó al género *Staphylococcus spp* (9%).

Tabla 12-3. Especies de bacterias identificadas del Manantial Termal del Balneario “Rumiloma”.

Nº DE CLONES AISLADOS	PORCENTAJE DE COINCIDENCIA (%)	BACTERIAS		PORCENTAJE (%)
		GÉNERO	ESPECIE	
4	92	<i>Xenorhabdus</i>	<i>Beddingii</i>	36,36
2	100	<i>Brevundimonas</i>	<i>Diminuta</i>	18,19
1	84,60	<i>Budvicia</i>	<i>Aquatica</i>	9,09
1	91,07	<i>Pseudomonas</i>	<i>Stutzeri</i>	9,09
1	92	<i>Bacillus</i>	<i>Mycoides</i>	9,09
1	71,43	<i>Bacillus</i>	<i>Spp</i>	9,09
1	71,56	<i>Staphylococcus</i>	<i>Spp</i>	9,09

Realizado por: JACHO, K., 2015

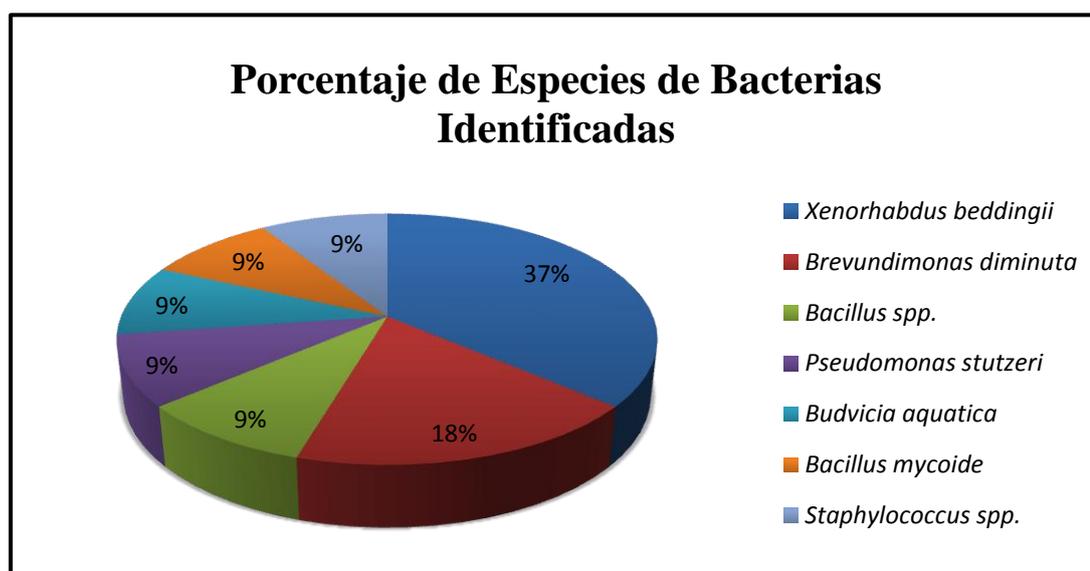


Gráfico 7-3. Porcentaje de especies de bacterias identificadas del Manantial Termal del Balneario “Rumiloma”

Realizado por: JACHO, K., 2015

Los resultados obtenidos para la identificación de los clones aislados, indica que existe predominio de la Familia *Enterobacteriaceae* constituida por bacilos Gram negativos, no esporulados, oxidasa negativa, catalasa variable, siendo en este caso la mayor parte negativas, móviles. Suelen ser fermentativas y oxidativas de glucosa, crecen en medios selectivos Mac Conkey y Eosina azul de metileno a una su temperatura de 35°C. (Granados & Villaverde, 2003, p. 250)

Las bacterias *Brevundimonas diminuta* y *Bacillus spp.*, se encontraron en el chorro de agua el cual fue uno de los puntos de muestreo realizados en el Balneario “Rumiloma”.

Brevundimonas diminuta son microorganismos ambientales con distribución mundial aislados del agua, el suelo, las plantas y ocasionalmente de especímenes clínicos. (Rocha, et al., 2006, p. 239) Son bacilos Gram negativos, rectos, delgados, no formadores de esporas, aerobios, de catalasa variable, móviles, oxidasa positiva y O/F de la glucosa oxidativos, crece a una temperatura de 35°C en medios selectivos como Mac Conkey y Eosina azul de metileno. (Macfaddin, 2003, p. 470)

Xenorhabdus beddingii es una bacteria grande, entomopatógena que está íntimamente asociada con nematodos entomógenos, siendo su hábitat normal el lumen intestinal de nematodos o la cavidad del cuerpo de los insectos huésped en la que han sido introducidos por los nematodos. (Thomas & Poinar, 1979, p. 352)

Budvicia aquatica es una bacteria de agua dulce que se puede encontrar tanto en agua potable como en arroyos, ríos y piscinas no asociadas con heces o aguas residuales humanas, no ha sido identificada como bacteria causante de enfermedades en los seres humanos. (Dworkin, et al., 2006, p. 9)

Mosso, et al. (2008) en el Balneario Valdelateja y De La Rosa, et al. (2013) en el Balneario El Raposo realizaron estudios microbiológicos en los manantiales mineromedicinales reportaron la presencia de diversas especies de enterobacterias como *Budvicia aquatica*, bacteria que forma parte de la microbiota del agua y del suelo por lo que no son un riesgo para la salud de los usuarios, especie que concuerda con la identificada en el Balneario “Rumiloma”.

Pseudomonas stutzeri son bacilos Gram negativos, aerobios, rectos o ligeramente curvos, no esporulados, catalasa positiva, oxidasa variable, móvil, O/F de la glucosa oxidativos, temperatura óptima de crecimiento de 35°C en medios Mac Conkey y Eosina azul de metileno, cuentan con un solo flagelo polar y se hallan presentes en casi todos los ambientes. (Lalucat, et al., 2006, p. 510)

En el 2004 y 2007 De la Rosa, et al. en el Balneario de Jaraba y Balneario de Puente Viesgo realizaron análisis microbiológicos en el que reportaron la presencia de la bacteria *Pseudomonas stutzeri*, especie también encontrada en el Balneario “Rumiloma”, la misma que es frecuente en aguas minerales ya que son bacterias que tienen requerimientos nutricionales escasos por lo que son capaces de sobrevivir y multiplicarse en ambientes oligotróficos.

Bacillus mycoides es una bacteria Gram positiva, no móvil, su tamaño oscila entre 1,0- 1,2 x 3,0- 5,0 µm, las esporas que forma pueden ser elipsoidales, central, paracentral o subterminal, no presentan cápsula y los bacilos tienden a presentarse en cadenas. Las colonias son de color blanco a crema opaco y característicamente rizoides, anaerobios facultativos, crecen a una temperatura máxima de 35 a 40 ° C y como temperatura mínima de 10 a 15°C, son bacterias comunes del suelo y suelen ser utilizadas en los pesticidas para inhibir el crecimiento de bacterias y hongos perjudiciales. No parece haber ningún efecto negativo en los seres humanos o en el medio ambiente. (Di Franco, et al., 2002, p. 33)

De La Rosa, et al. (2013) en el Balneario El Raposo identificará la presencia de bacilos Gram positivos principalmente del género *Bacillus*, bacterias esporuladas que proceden del suelo encontradas en manantiales minerales termales. Estos resultados coinciden con lo reportado en este trabajo para el Balneario “Rumiloma” donde encontramos la presencia de bacterias bacilos Gram positivos del género *Bacillus spp.* y *Bacillus mycoides* frecuente en aguas minerales termales.

También se encontró la presencia del género *Staphylococcus* cocos Gram positivos dispuestos en forma aislada, en pares o en forma similar a racimos de uvas, no forman esporas, de catalasa positiva, oxidasa variable en este caso negativa, O/F de la glucosa fermentativa, temperatura óptima de crecimiento 35°C, crecimiento y fermentación de agar manitol en este caso hubo crecimiento pero no fermentación de manitol. (Macfaddin, 2003, p. 511)

Mosso, Sánchez y De La Rosa, (2002) realizaron un estudio de la Microbiología del agua mineromedicinal de los Balnearios de Alhama de Granada aislando e identificando cepas de bacterias heterótrofas que pertenecen al género *Bacillus*, *Micrococcus* y *Staphylococcus*; Mosso, et al. (2006) en el Balneario Cervantes identificaron cepas reportando la presencia de cocos Gram positivos en baja proporción que corresponden en su mayoría al género *Staphylococcus* y cepas de bacilos Gram positivos, del género *Bacillus spp.* Estos géneros concuerdan con los encontrados en el Balneario en estudio (*Staphylococcus spp.*, *Bacillus spp.*), por ejemplo la presencia de *Bacillus mycoides* que son cepas de bacilos Gram positivos esporulados, reportadas como ambientales y que pueden llegar al agua mediante el aire, el suelo y la lluvia.

3.11 Antibiograma de Bacilos Gram Negativos

La evaluación del efecto de los antibióticos (Trimetoprim/sulfametoxazol, Imipenem, Amoxicilina/Ac. clavulánico, Ceftriaxona, Gentamicina, Cefalotina, Ampicilina) sobre los clones aislados muestra resultados muy variados (Tabla 13-3).

Tabla 13-3. Antibiograma de bacilos Gram negativos del Manantial Termal del Balneario “Rumiloma”.

N° CLON	NOMBRE	ANTIBIÓTICOS						
		CRO 30	KF 30	SXT 25	CN 10	IPM 10	AM 10	AMC 20/10
1	<i>Xenorhabdus beddingii</i>	S	R	R	S	S	R	S
3	<i>Xenorhabdus beddingii</i>	S	R	S	S	S	R	S
4	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	S	R	S	R	S	R	S
6	<i>Xenorhabdus beddingii</i>	S	R	S	S	S	S	S
17	<i>Brevundimonas diminuta</i>	S	R	S	S	S	R	R
18	<i>Budvicia aquatica</i>	S	R	S	S	S	S	S
19	<i>Brevundimonas diminuta</i>	S	R	S	S	S	R	R
21	<i>Xenorhabdus beddingii</i>	S	R	S	S	S	S	S

R: Resistente
S: Sensible
CRO: Ceftriaxona 30 µg
SXT: Trimetoprim/Sulfametoxazol 1,25/23,75 µg
AMC: Amoxicilina/Ácido Clavulánico 20/10 µg

CN: Gentamicina 10 µg
IPM: Imipenem 10 µg
AM: Ampicilina 10 µg
KF: Cefalotina 30 µg

Realizado por: JACHO, K., 2015.

En los antibiogramas realizados a las cepas de bacilos Gram negativos se observa que todas las bacterias son resistentes a la Cefalotina de 30 µg, el cual es una cefalosporina de primera generación a diferencia de la Ceftriaxona (30 µg), Trimetoprim/Sulfametoxazol (1,25/23,75 µg), Gentamicina (10 µg) e Imipenem (10 µg) antibióticos de amplio espectro los cuales inhibieron el crecimiento de todas las bacterias estudiadas.

En un estudio realizado del perfil de sensibilidad antibiótica en especies de la Familia *Enterobacteriaceae* se observó resistencia a ampicilina, ampicilina-sulbactama, cefalotina, aminopenicilinas (ampicilina y amoxicilina). (Lösch, Merino & Alonso, 2006, p. 2)

López, et al. (2002) analizaron un caso de endocarditis polimicrobiana de curso subagudo aislando *Pseudomonas stutzeri* y realizando la prueba de sensibilidad por el método disco placa

reportando que la *Pseudomonas stutzeri* es sensible a los antibióticos: amoxicilina-ácido clavulánico, cefalosporinas de tercera generación, aminoglucósidos, quinolonas e imipenem y suelen tener resistencia a cefalosporinas de primera generación. Nuestros resultados del antibiograma de la bacteria *Pseudomonas stutzeri* son similares ya que esta especie presentó sensibilidad a los siguientes antibióticos: amoxicilina-ácido clavulánico, ceftriaxona e imipenem y resistencia a la cefalotina.

Vay, et al. (2005) realizaron un estudio de sensibilidad antimicrobiana sobre bacilos gram-negativos no fermentadores determinándose las concentraciones inhibitorias mínimas por el método de dilución en agar Mueller Hinton frente a los siguientes antibacterianos: ampicilina, piperacilina, piperacilina-tazobactama, sulbactama, cefoperazona, cefoperazona-sulbactama, ceftazidima, cefepima, aztreonam, imipenem, meropenem, colistina, gentamicina, amikacina, trimetoprim-sulfametoxazol, cloranfenicol, eritromicina, rifampicina, norfloxacin, ciprofloxacina y minociclina, reportándose que la *Pseudomonas stutzeri* fue ampliamente sensible a los antibacterianos ensayados. Al cotejar con nuestros resultados la bacteria *Pseudomonas stutzeri* presentó sensibilidad al imipenem y trimetoprim/sulfametoxazol.

Restrepo, et al. (2010) en un estudio de Artritis reactiva asociada con bacteriemia por *Brevundimonas diminuta* realizaron un perfil de resistencia de aislamientos de especies de *Brevundimonas* de los Centros para Control de Enfermedades de los Estados Unidos y susceptibilidad a los aminoglucósidos, con resistencia importante a ampicilina, así como susceptibilidad variable a penicilinas y cefalosporinas de tercera generación. Al comparar la susceptibilidad con los resultados obtenidos en el antibiograma de la bacteria *Brevundimonas diminuta* son similares con los antibióticos gentamicina y ceftriaxona, y su resistencia a la ampicilina.

Se realizó un estudio de un caso de sepsis en un paciente inmunodeprimido expuesto a *Budvicia aquatica* en la que reportaron que esta especie es sensible a varios agentes antibióticos; siendo así el paciente tratado con éxito con levofloxacina intravenosa, seguida de una dosis de dos semanas con ciprofloxacina oral. (Dworkin, et al., 2006, p. 10).

3.12 Antibiograma de Bacilos y Cocos Gram Positivos

La evaluación del efecto de los antibióticos (Ampicilina, Gentamicina, Cefalotina, Ciprofloxacina, Eritromicina, Penicilina, Oxacilina, Novobiocina, ácido Nalidixico) sobre los clones aislados muestra resultados muy variados (Tabla 14-3).

Tabla 14-3. Antibiograma de bacilos y cocos Gram positivos del Manantial Termal del Balneario “Rumiloma”.

N° CLON	NOMBRE	ANTIBIÓTICOS								
		AM 10	CN 10	KF 30	CIP 5	E 15	P 10	OX 1	NV 30	NA 30
1	<i>Bacillus mycooides</i>	S	S	S	S	S	S	R	ND	ND
9	<i>Bacillus spp.</i>	R	S	R	S	S	R	R	ND	ND
18	<i>Staphylococcus spp.</i>	R	S	S	S	ND	ND	R	S	R

R: Resistente
S: Sensible
AM: Ampicilina 10 µg
CN: Gentamicina 10 µg
KF: Cefalotina 30 µg
CIP: Ciprofloxacina 5 µg

NR: No tiene disco
E: Eritromicina 15 µg
P: Penicilina G 10 U
OX: Oxacilina 1 µg
NV: Novobiocina 30 µg
NA: Ácido Nalidixico 30 µg

Realizado por: JACHO, K., 2015

Los bacilos Gram positivos presentaron susceptibilidad a los siguientes antibióticos: Gentamicina (10 µg), Ciprofloxacina (5 µg), Eritromicina (15 µg) y resistencia a la Ampicilina (10 µg), Cefalotina (30 µg), Penicilina G (10 U) y Oxacilina (1 µg).

Los cocos Gram positivos presentaron resistencia a la Ampicilina (10 µg), Oxacilina (1 µg), Ácido Nalidixico (30 µg) y sensibilidad a Gentamicina (10 µg), Cefalotina (30 µg), Ciprofloxacina (5 µg) y Novobiocina (30 µg).

En un estudio realizado de sensibilidad antimicrobiana con 35 antibióticos pertenecientes a los diferentes grupos farmacológicos se ha revelado que las bacterias *Bacillus spp.*, presentan mayor sensibilidad a los antibióticos: cloranfenicol, amikacina, doxiciclina, kanamicina, novobiocina, tetraciclina y ampicilina. (GALLEGO, et al., 1994, p. 713). En nuestro estudio antibióticos en el antibiograma de la bacteria *Bacillus spp.*, por tal razón solo coincide resistencia a la ampicilina.

El *Bacillus mycoides* presenta susceptibilidad a la mayoría de los antibióticos probablemente debido a que son microorganismos ambientales.

Herrera, et al. (1994) tras realizar un estudio del Patrón de sensibilidad de las cepas de *Staphylococcus sp.* aisladas en el Hospital Nacional de Niños reportaron que dicha bacteria es susceptible a oxacilina, eritromicina, vancomicina, ciprofloxacina, cloranfenicol, norfloxacina y rifampicina. Estos resultados concuerdan con los nuestros debido a que el género *Staphylococcus sp* presentó sensibilidad al antibiótico ciprofloxacina.

3.13 Presencia Fenotípica de Metallo β -Lactamasas

En el estudio la presencia de la enzima Metallo β -Lactamasas nos va indicar que hidroliza una gran variedad de antibióticos β -lactámicos, incluyendo penicilinas, cefalosporinas (1^a, 2^a, 3^a y 4^a generación) y carbapenemes. Esta actividad se observa cuando se produce una deformación del halo de inhibición en las proximidades del disco de EDTA lo que indica la presencia de algún tipo de metalo β -lactamasas en la cepa de estudio. (Navajas, 2013, p. 27)

Tabla 15-3. Presencia fenotípica de metalo β -lactamasas en clones aislados puros Gram negativos del Manantial Termal del Balneario “Rumiloma”.

Nº CLON	NOMBRE	PRUEBA DE DISCO CON EDTA (0,5 M)
1	<i>Xenorhabdus beddingii</i>	Negativo
3	<i>Xenorhabdus beddingii</i>	Negativo
4	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Negativo
6	<i>Xenorhabdus beddingii</i>	Negativo
17	<i>Brevundimonas diminuta</i>	Negativo
18	<i>Budvicia aquatica</i>	Negativo
19	<i>Brevundimonas diminuta</i>	Negativo
21	<i>Xenorhabdus beddingii</i>	Negativo

Realizado por: JACHO, K., 2015

En la Tabla 15-3 se observan los resultados obtenidos tras la realización de la prueba de presencia fenotípica de metalo β -lactamasas la cual es negativa para todas las cepas de bacterias realizadas.

CONCLUSIONES

Se determinó los parámetros in situ del agua del Balneario “Rumiloma” presentando una temperatura de 30,5°C y una temperatura ambiente de 22°C, un valor de pH 8, conductividad de 990,5 $\mu\text{S}/\text{cm}$ y sólidos totales disueltos de 492,5 ppm.

En la fuente se encontraron aerobios mesófilos $2,0 \times 10^3$ UFC/mL, mohos 3,5 UFC/mL, levaduras 5,0 UFC/mL, coliformes totales $8,6 \times 10^1$ UFC/mL, coliformes fecales 1,0 UFC/mL y un promedio de $1,0 \times 10^1$ UFC/mL de bacterias del género *Staphylococcus*.

En el chorro de agua la presencia de bacterias aerobias mesófilas fue de $2,3 \times 10^1$ UFC/mL, 4,0 UFC/mL de coliformes totales, 1,5 UFC/mL de levaduras y ausencia de coliformes fecales, mohos y de bacterias del género *Staphylococcus*.

Se aislaron 45 colonias bacterianas que corresponden a los tipos morfológicos de bacilos Gram negativos (60%), bacilos Gram positivos (20%) y cocos Gram positivos (9%).

Las 11 especies bacterianas identificadas fueron: 4 *Xenorhabdus beddingii* (37%), 2 *Brevundimonas diminuta* (18%), 1 *Budvicia aquatica* (9%), 1 *Pseudomonas stutzeri* (9%), 1 *Bacillus mycoides* (9%), 1 *Bacillus spp.* (9%) y 1 *Staphylococcus spp.* (9%).

En cuanto a la susceptibilidad de los antibióticos el *Bacillus spp.* obtuvo resistencia a 4 antibióticos (Ampicilina, Cefalotina, Penicilina y Oxacilina) en el caso de las especies *Xenorhabdus beddingii*, *Pseudomonas stutzeri*, *Brevundimonas diminuta* presentaron resistencia hasta 3 antibióticos mientras que las especies *Budvicia aquatica* y *Bacillus mycoides* fueron sensibles a los antibióticos utilizados en el estudio.

Se encontró que las especies del género *Xenorhabdus*, *Pseudomonas*, *Brevundimonas* y *Budvicia* aisladas del Balneario “Rumiloma” son sensibles a los antibióticos Ceftriaxona, Trimetoprim/Sulfametoxazol, Gentamicina, Imipenem y resistentes a la Cefalosporina.

RECOMENDACIONES

Dar mantenimiento a la infraestructura del túnel periódicamente para evitar la presencia de insectos que tienen libre acceso.

Colocar un candado en la puerta de acceso al túnel para que solo personal autorizado sea el responsable de abrirlo.

Realizar periódicamente estudios microbiológicos en el agua del balneario para garantizar la salud de los bañistas.

BIBLIOGRAFÍA

AQUIAHUATL, M^a. De los Ángeles; et al. *Manual de Prácticas de Laboratorio Microbiología General* [en línea]. Iztapalapa-México: Editorial Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, 2012. [Consulta: 2015-04-12]. Disponible en: https://izt.uam.mx/ceu/publicaciones/MMBG/files/manual_microbiologia_general

AQUICITO. *Parroquias del Distrito Metropolitano de Quito* [en línea]. 2014. [Consulta: 2014-12-27]. Disponible en: <http://www.quito.com.ec/parroquias/index.php>

BADO, Inés; et al. *Temas de Bacteriología y Virología Médica*. 2^{da} edición. Montevideo-Uruguay: Oficina del libro FEFMUR, 2008, pp. 24-25.

BAILÓN, Lucía; CRUZ, Roberto & CERVANTES, Armando. *Atlas de Pruebas Bioquímicas para Identificar Bacterias*. Zaragoza-España, 2003, pp. 48-92.

BARRIOS, Alberto & BERTHOULY, Marc. *Tecnología del Cultivo de Café (Coffea arabica). Medios y Métodos de Cultivo In Vitro*. 2^{da} edición. Turrialba-Costa Rica, 1987, pp. 2.

CARRASCO, Washington & NAULA, Wilson. *Caracterización y elaboración de un inventario de fuentes geotérmicas de baja entalpia en la provincia de Chimborazo y propuesta de creación de un centro de investigación de energía geotérmica en la ESPOCH*. (Tesis pregrado). Biofísico. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias. Escuela de Física y Matemáticas. Riobamba-Ecuador, 2012, pp. 82-83.

CASASO, M^a. Concepción; TORRICO, Gertrudis & MEDINA, María. *Medios de Cultivo en un Laboratorio de Microbiología* [en línea]. 2012. [Consulta: 2015-04-15]. Disponible en: <https://libroslaboratorio.files.wordpress.com/2012/09/medios-de-cultivo-en-un-laboratorio-de-microbiologc3ada.pdf>

CASTRO, Nohelia & CHAIDES, Cristóbal. *Riesgos Microbiológicos Asociados al Uso de Piscinas Públicas*. S Nivel Básico. 2003, pp. 18.

CIBEIRA, Rosa. *Los primeros usos del agua termal y mineral*. Ponencia realizada en las Jornadas Internacionales de Turismo. Federación-Entre Ríos- Argentina. 2000.

CUETOS, Yolanda; et al. *Control preventivo de Legionelosis en instalaciones de riesgo de la CAPV. Guía para la toma de muestras* [en línea]. Vasco-España: Departamento de Sanidad y Consumo, 2012, pp. 7-10. [Consulta: 2015-04-13]. Disponible en: http://www.euskadi.eus/contenidos/informacion/legionella_plan/es_llo/adjuntos/muestras.pdf

DE LA ROSA, M^a. Ángeles; et al. “Microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario Alicún de las Torres”. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, vol. 74, (2009), (Madrid-España) pp. 772-769.

DE LA ROSA, M^a. Carmen; et al. “Análisis Microbiológico de las aguas mineromedicinales El Raposo”. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, vol. 32, (2013), (Madrid-España) pp. 73-76.

DE LA ROSA, M^a. 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. 532-536.

DE LA ROSA, M^a. Carmen; et al. “Estudios sobre el Balneario de Puente Viesgo (Cantabria)”. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, vol. 73, (2007), (Madrid-España) pp.258-260.

DI FRANCO, Carmen; et al. “Colony shape as a genetic trait in the pattern-forming *Bacillus mycoides*”. *Revista PubMed* [en línea], 2002, (Roma-Italia) vol. 2, pp. [Consulta: 2015-05-10]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles>

DWORKIN, Martín; et al. *The Prokaryotes: Proteobacteria: Gamma Subclass*. 3^{ra} edición. Minnesota-USA: Editorial University of Minnesota, 2006, pp. 9-10.

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGÍA E HIDROLOGÍA. *Aguas termominerales del Ecuador* [en línea]. Quito-Ecuador, 2013. [Consulta: 2014-12-27]. Disponible en: <http://issuu.com/inamhi/docs/termalismo>

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*. (Postgrado). Universidad de Los Andes. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Escuela Química de Medicamentos. Mérida-Venezuela, 2013, pp.74

FRANCÉS, M^a. Carmen; et al. “Estudios sobre El Balneario de Alicún de las Torres (Granada)”. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, vol. 75 (2009), (Madrid-España) pp. 768.

FRANCÉS, M^a. Carmen; et al. “Balneario de Baños de la Concepción de Villatoya (Albacete)”. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, vol. 77 (2011), (Madrid-España) pp. 43-61.

GALLEGO, Laureano; et al. *Producción ovina y caprina*. Albacete-España: Universidad de Castilla-La Mancha, 1994, pp. 713.

GARCÍA, M^a. José & SILVA, M^a. Del Carmen. *Manual del Técnico Superior de Laboratorio de Análisis Clínicos, Módulo II Microbiología, Enzimología e Inmunología*. Alcalá de Guadaíra-Sevilla-España: Editorial Mad, S.L, 2004, pp. 125-126.

GARCÍA, Misericordia; et al. *ATS/DUE. Personal Laboral de Extremadura*. 2^{da} edición. Sevilla-España: Editorial Mad, S.L, 2006, pp. 598-599.

GARCÍA, Pedro; et al. *Microbiología Clínica Aplicada* [en línea]. 3^{ra} edición. Madrid-España: Editorial Díaz de Santos, S.A, 1997, pp. 23. [Consulta: 2015-04-13]. Disponible en: <https://books.google.com.ec/books?id=O1pigUGRprwC&pg=PA23&lpg=PA23&dq=Microscopia+de+las+Bacterias.++Garcia&source=bl&ots=SI0oiftABu&sig=Q>

GESTIÓN DE AGUAS Y RESIDUOS (GEDAR). *Manual de Salud Ambiental* [en línea]. Granada-España, pp. 36. [Consulta: 2015-06-22]. Disponible en: <http://www.gedar.com/PDF/Piscina/GEDAR-piscinas.pdf>

GIBERT, Agustín. *Guía desarrollada por Termasalud*. Argentina, 2010, pp. 2-10.

GLYNN, Henry & HEINKE, Gary. *Ingeniería Ambiental*. 2^{da} edición. Naucalpan-México: Editorial Prentice Hall Hispanoamericana S.A, 1996, pp. 274.

GOBIERNO PARROQUIAL. *Guangopolo* [en línea]. 2008. [Consulta: 2014-12-27]. Disponible en: <http://www.guangopolo.gob.ec/pichincha/>

GÓMEZ, Domingo; et al. *Auxiliares Sanitarios de la Comunidad Autónoma de las Illes Balears*. Sevilla-España: Editorial MAD, S.L, 2002, pp. 535.

GRANADOS, Raquel & VILLAVERDE, M^a. Carmen. *Bacteriología. Características y Clasificación bacteriana. Características y técnicas bioquímicas* [en línea]. Madrid-España: Editorial Paraninfo, S.A, 2003. [Consulta: 2015-04-13]. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=sUrIecdf_O8C&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false

HERRERA, Marco; et al. “Patrón de sensibilidad de las cepas de *Staphylococcus sp.* aisladas en el Hospital Nacional de Niños en un período de 9 meses”. *Revista Médica Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Saenz Herrera* [en línea], 1994, (San José-Costa Rica) vol.29, pp. 42-43. [Consulta: 2015-06-24]. Disponible en: <http://www.binasss.sa.cr/revistas/rmhnn/v29n1-21994/art5.pdf>

HOPEY, Michelle., EcuadorExplorer.com., *Aguas termales y spas en Ecuador* [en línea]. 2013. [Consulta: 2014-12-27]. Disponible en: <http://www.ecuadorexplorer.com/es/html/aguas-termales-y-spas.html>

LALUCAT, Jorge; et al. “Biology of *Pseudomonas stutzeri*”. *Revista PubMed*, vol. 70, n° 2 ((2006), (Palma Mallorca-España) pp. 510.

LARRAIZA, Leire. *Clasificación de las aguas termales* [en línea]. Madrid-España. 2014, pp. 9. [Consulta: 2014-10-23]. Disponible en: <http://www.leirelarraiza.com/operativa/clasificacion-de-las-aguas-termales/>

LÓPEZ, A; et al. “Endocarditis polimicrobiana por *Streptococcus salivarius* y *Pseudomonas stutzeri*: buena evolución tras cirugía precoz”. *Scielo Anales de Medicina Interna*, vol. 19, n°1 (2002), (Madrid-España) pp. 53-54.

LÓPEZ, Luis; et al. “Las Tinciones Básicas en el Laboratorio de Microbiología”. *Revista Medigraphic*, vol. 3, n° 1 (2014), (Tlalpan-México) pp. 12.

LÖSCH, Liliana; MERINO, Luis & ALONSO, José. “Estudio del perfil de sensibilidad antibiótica en especies de la Familia *Enterobacteriaceae* aisladas de fuentes de agua de la provincia del Chaco”. *Universidad Nacional del Nordeste Comunicaciones científicas y tecnológicas*, vol. 22 (2006), (Corrientes-Argentina) pp. 2.

MACFADDIN, Jean. *Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica.* 3ª edición. Buenos Aires-Argentina: Editorial Médica Panamericana S.A, 2003, pp. 470-632.

MARAVÉ, F; et al. *Vademécum de aguas mineromedicinales españolas.* Madrid-España: Editorial San Carlos, 2003, pp. 13-16.

MARRERO, Deysi. *Guía para la Identificación de las Bacterias más Frecuentes en el Laboratorio de Microbiología Clínica.* Concepción-Chile. 2006, pp. 8.

MÉNDEZ, Avilio. “Aguas Termales Cura Termal”. *Revista GeoSalud*, vol. 1, n° 8 (2010), (Caracas-Venezuela) pp. 4.

MONTOYA, Hugo. *Microbiología Básica para el Área de la Salud y Afines.* 2^{da} edición. Antioquia-Colombia: Editorial Universidad de Antioquia, 2008, pp. 22-23.

MOSSO, M. A; SÁNCHEZ, M. C. & DE LA ROSA, M.C. “Microbiología del agua mineromedicinal de los Balnearios de Alhama de Granada”. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, vol. 68 (2002), (Madrid-España) pp.56.

MOSSO, M^a. Ángeles; et al. “Microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario Cervantes”. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, vol. 72 (2006), (Madrid-España) pp. 294-298.

MOSSO, M^a. Ángeles; et al. “Microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario de Valdelateja”. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, vol. 74 (200), (Madrid-España) pp. 512-516.

MOSSO, M^a. Ángeles & DE LA ROSA, M^a. Carmen. “Microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario de Baños de la Concepción (Albacete)”. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, vol.77 (2011), (Madrid-España) pp. 62.

3M. España S.A. (2009). *Petriefilm. Guía de interpretación: 1-80.*

NAVAJAS, Enrique. *Diseminación, área de Enterobacterias en el entorno de una granja bovina y estudio de los fenotipos y genotipos de resistencia a antibióticos.* (Tesis de pregrado).

Grado en Química, Universidad de Rioja. Facultad de Ciencias. Escuela de Estudios Agroalimentarios e Informática. España, 2013, pp. 27.

NTE INEN 2176:2013. *Agua. Calidad del agua. Muestreo. Técnicas de muestreo.*

OBÓN, José María. *Análisis microbiológico del agua.* (Tesis de pregrado). Ingeniero Químico y Ambiental. Universidad Politécnica de Cartagena. Departamento de Ingeniería Química y Ambiental. Cartagena-Colombia, pp. 20-23.

OLIVAS, Evangelina & ALARCÓN, Luis. *Manual de Prácticas de Microbiológica Básica y Microbiología de Alimentos.* Juárez-Chihuahua-México: Editorial Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, 2004, pp. 35.

PAHISSA, Albert. *Infecciones Producidas por *Shaphylococcus aureus*.* Barcelona-España: Editorial Novoprint (Sant Andreu de la Barca, Barcelona), 2009, pp. 17-23.

Procedimientos en Microbiología Clínica. *Métodos de Identificación Bacteriana en el Laboratorio de Microbiología* [en línea]. [Consulta: 2015-04-12]. Disponible en: <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf>

RESTREPO, Mauricio; et al. “Artritis reactiva asociada con bacteriemia por *Brevundimonas diminuta*”. *Revista Colombiana de Reumatología* [en línea], 2010, (Bogotá-Colombia) vol. 17, (n°4), pp. 245-248. [Consulta: 2015-06-24]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rcrc/v17n4/v17n4a06>

RIBAS, Bartolomé; et al. “Balnearios de España Aguas Minero Medicinales El Raposo”. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, vol. 32 (2013), (Madrid-España) pp. 69.

ROCHA, Rosa; LOZANO, Patricia & MARTÍNEZ, Ygnacio. *Mecanismos de Patogenicidad e Interacción Parásito-Hospedero II.* Puebla-México: Editorial Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 2006, pp. 239.

RODÉS, Benito. *Control de Calidad de las Aguas Minero-Medicinales. Panorama Actual de las Aguas Minerales y Minero-Medicinales en España* [en línea]. Barcelona-España, 2000. [Consulta: 2014-12-15]. Disponible en: <http://aguas.igme.es/igme/publica/pdfart3/control.pdf>

RODRÍGUEZ, Evelyn; et al. *Bacteriología General Principios y Prácticas de Laboratorio*. Costa Rica: Editorial Universidad de Costa Rica, 2005, pp. 141-323.

SAHM, Daniel & WEISSFELD, Alice. *Bailey & Scott Diagnóstico Microbiológico*. 12ª edición. Madrid-España. 2009, pp. 187-244.

SALGADO, Víctor. *Análisis de mesófilos aerobios, mohos y levaduras, coliformes totales y Salmonella spp. en cuatro ingredientes utilizados en la planta de lácteos de Zamorano, Honduras*. (Tesis de pregrado). Ingeniero Agrónomo. Escuela de Agroindustria. Zamorano-Honduras, 2002, pp. 9-10.

SILVA, M^a. Del Carmen; et al. *Técnico Especialista en Laboratorio del Servicio Gallego de Salud*. Alcalá de Guadaíra-Sevilla-España: Editorial Mad, S.L, 2006, pp. 64-187.

THOMAS, Gerard & POINAR, George. “*Xenorhabdus* gen nov a Genus of Entomopathogenic, Nematophilic Bacteria of the Family *Enterobacteriaceae*”. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1979, pp. 352. [Consulta: 2015-05-10]. Disponible en: <http://entnemdept.ufl.edu/nguyen/morph/biology>

TORIJA, M^a. Esperanza; et al. “Estudios sobre el Balneario Cervantes (Ciudad Real)”. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, vol. 72 (2006), (Madrid-España) pp. 293.

VAY, C.A; et al. “Actividad "in vitro" de diferentes antibacterianos sobre bacilos gram-negativos no fermentadores, excluidos *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter spp*”. *Revista Argentina de Microbiología* [en línea], 2005, (Buenos Aires-Argentina) vol.37 (nº1), pp. 34-45. [Consulta: 2015-06-24]. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=213016778006>

VILLALOBOS, Silvia; et al. “Susceptibilidad a los antibióticos de los *Staphylococcus sp* coagulasa negativa aislados de muestras clínicas”. *Revista Costarricense. Ciencia Médica* [en línea], 1986, (San José-Costa Rica) vol.7 (nº1), pp. 65-68. [Consulta: 2015-06-24]. Disponible en: <http://www.binasss.sa.cr/revistas/rccm/v7n1/art10.pdf>

VÍTOR, Paulo. *Aguas termales, usos y beneficios para la salud* [en línea]. Portugal, 2010, pp. 19. [Consulta: 2014-11-27]. Disponible en: <http://www.ipq.pt/DGS.pdf>

ZARAGOZA, Rafael; et al. *Microbiología Aplicada al Paciente Crítico*. Madrid-España: Editorial Médica Panamericana S.A, 2008, pp. 55-57.

ANEXOS

ANEXO A: Balneario “Rumiloma”



Fotografía 3: Acceso al Balneario
Fuente: JACHO, K. 2015.



Fotografía 4: Balneario Rumiloma
Fuente: JACHO, K. 2015.

ANEXO B: Puntos de muestreo realizados en el Balneario



Fotografía 5: Muestra 1 Fuente
Fuente: JACHO, K. 2015.



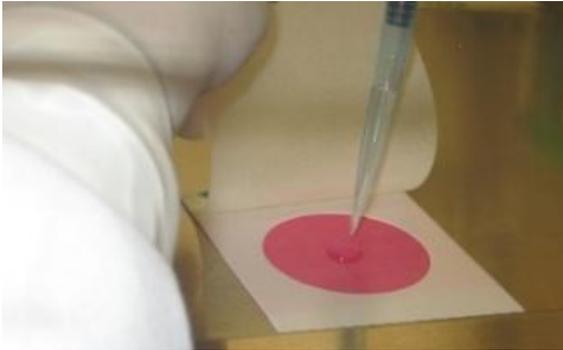
Fotografía 6: Muestra 2 Chorro de agua
Fuente: JACHO, K. 2015.

ANEXO C: Determinación de parámetros in situ (Multiparámetro HANNA)



Fotografía 7: Medición de parámetros físico-químicos
Fuente: JACHO, K. 2015.

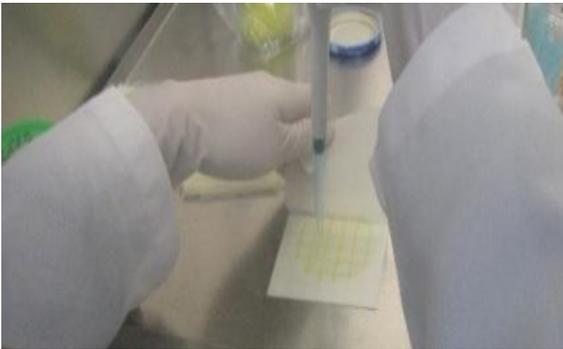
ANEXO D: Siembra en Petrifilm de las muestras tomadas (Fuente y Chorro de agua)



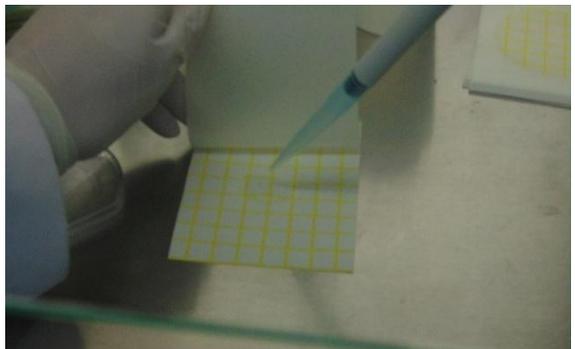
Fotografía 8: Siembra en Petrifilm para recuento de *E. coli*/coliformes
Fuente: JACHO, K. 2015.



Fotografía 9: Siembra en Petrifilm para recuento de Mohos y Levaduras
Fuente: JACHO, K. 2015.

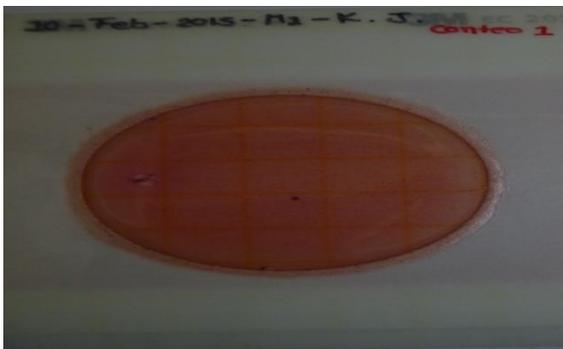


Fotografía 10: Siembra en Petrifilm para recuento de Staph Express
Fuente: JACHO, K. 2015.

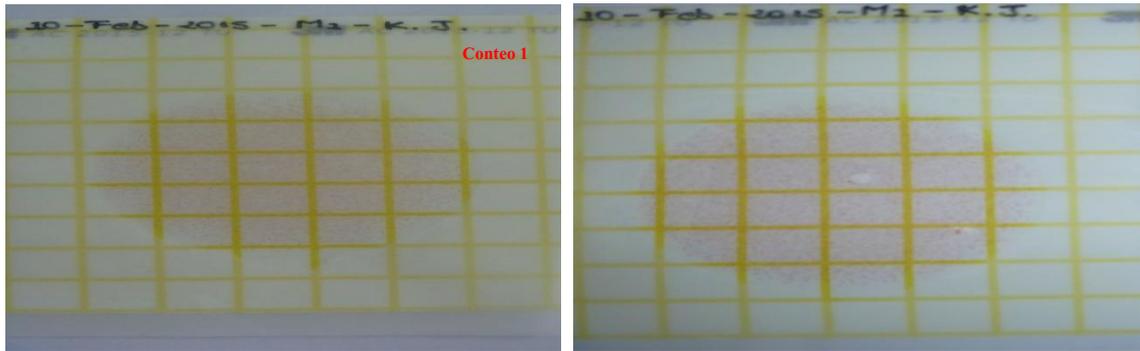


Fotografía 11: Siembra en Petrifilm para recuento de Aerobios totales
Fuente: JACHO, K. 2015.

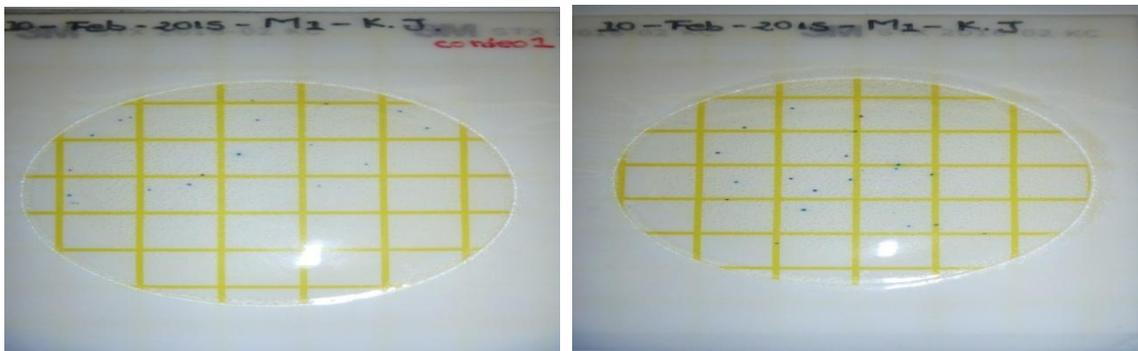
ANEXO E: Resultados del recuento de bacterias a las 48 horas de incubación de la muestra 1:
Fuente



Fotografía 12: Placas de recuento de *E. coli*/coliformes de la muestra 1 (fuente)
Fuente: JACHO, K. 2015.



Fotografía 13: Placas de recuento de Aerobios Totales de la muestra 1 (fuente)
Fuente: JACHO, K. 2015.

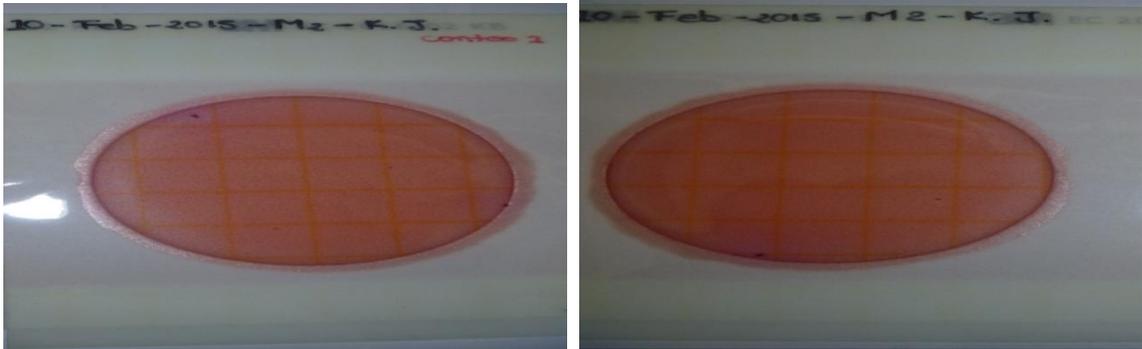


Fotografía 14: Placas de recuento de Staph Express de la muestra 1 (fuente)
Fuente: JACHO, K. 2015.



Fotografía 15: Placas de recuento de Mohos y Levaduras de la muestra 1 (fuente)
Fuente: JACHO, K. 2015.

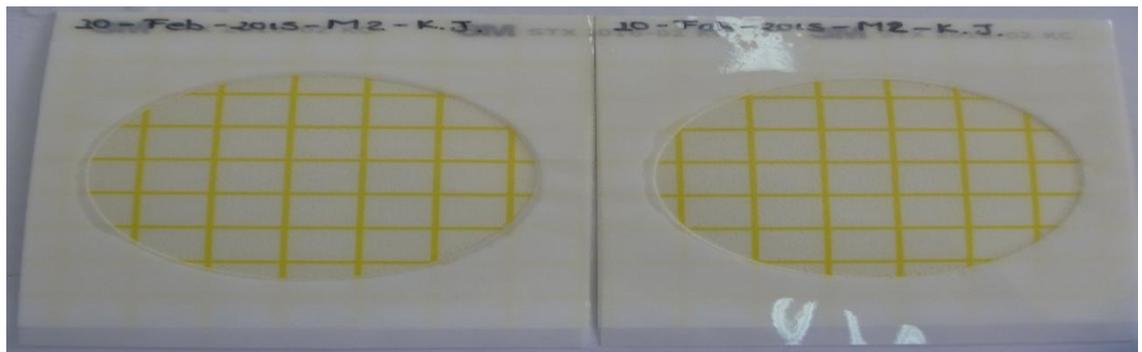
ANEXO F: Resultados del recuento de bacterias a las 48 horas de incubación de la muestra 2:
Chorro de agua



Fotografía 16: Placas de recuento de *E. coli*/coliformes de la muestra 2 (chorro)
Fuente: JACHO, K. 2015.



Fotografía 17: Placas de recuento de Aerobios Totales de la muestra 2 (chorro)
Fuente: JACHO, K. 2015.

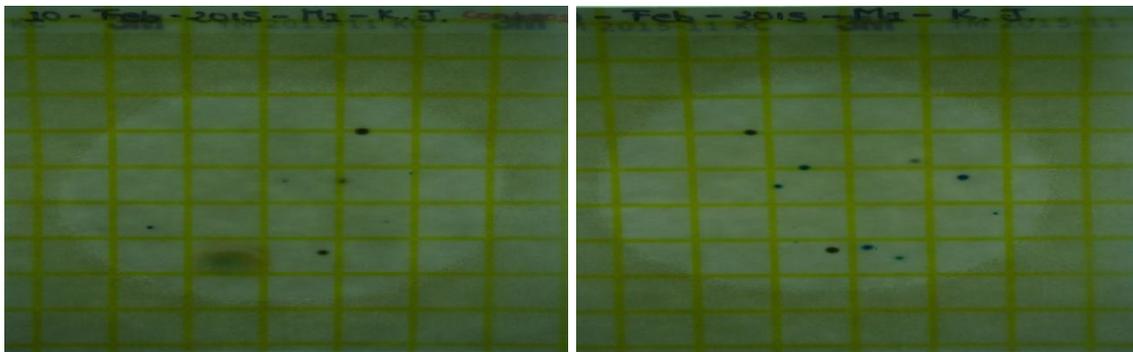


Fotografía 18: Placas de recuento de Staph Express de la muestra 2 (chorro)
Fuente: JACHO, K. 2015.

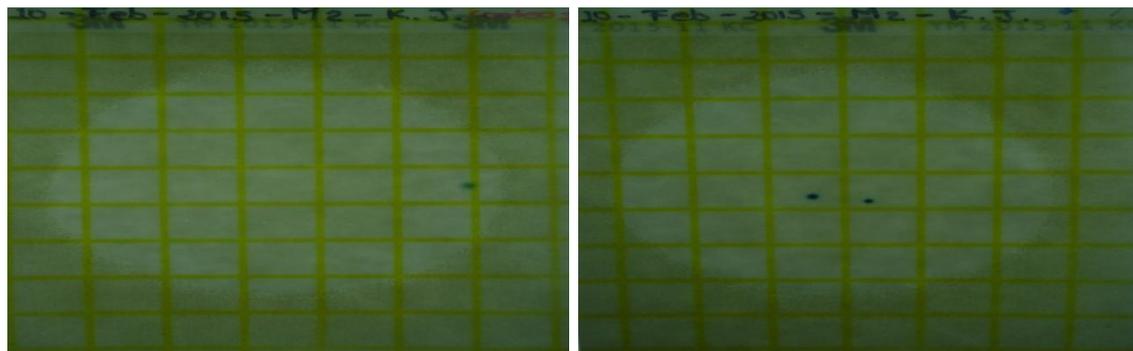


Fotografía 19: Placas de recuento de Mohos y Levaduras de la muestra 2 (chorro)
Fuente: JACHO, K. 2015.

ANEXO G: Resultados del recuento de Mohos y Levaduras a los 7 días

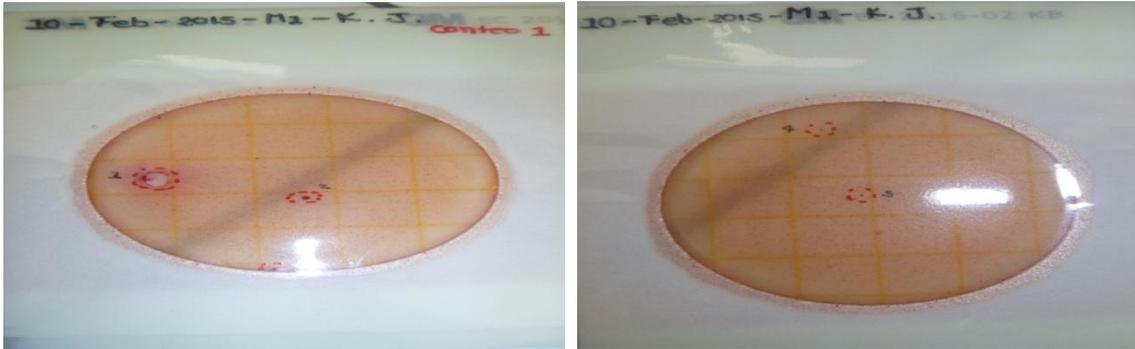


Fotografía 20: Placas de recuento de Mohos y Levaduras de la muestra 1 (fuente)
Fuente: JACHO, K. 2015.



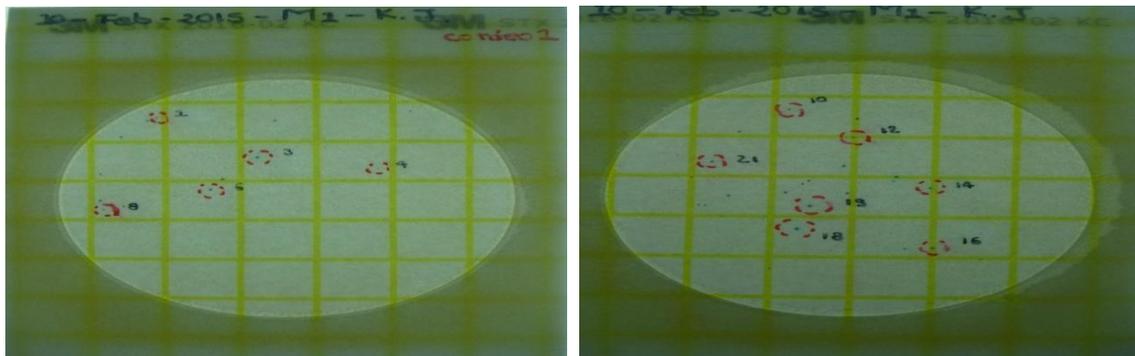
Fotografía 21: Placas de recuento de Mohos y Levaduras de la muestra 2 (chorro)
Fuente: JACHO, K. 2015.

ANEXO H: Clones seleccionados para la realización de repiques



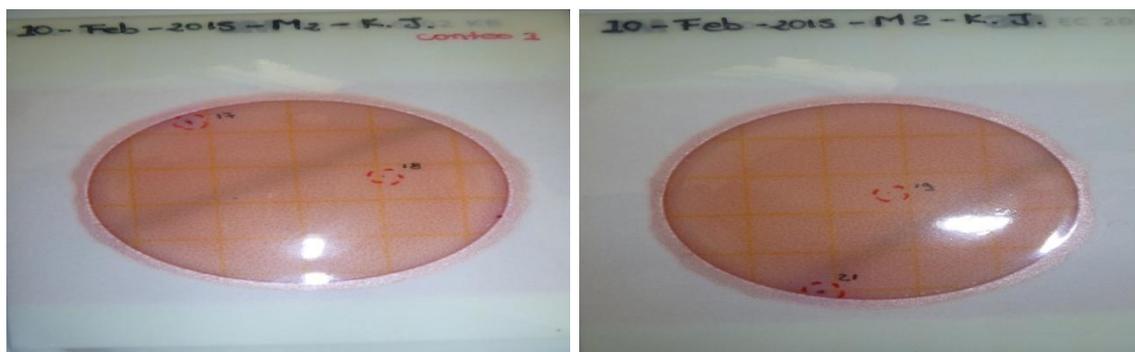
Fotografía 22: Placas de *E. coli*/coliformes de la muestra 1 (fuente) seleccionadas para realizar los repiques.

Fuente: JACHO, K. 2015.



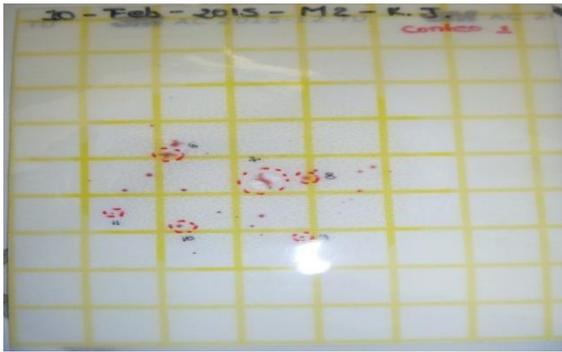
Fotografía 23: Placas de Staph Express de la muestra 1 (fuente) seleccionadas para realizar los repiques.

Fuente: JACHO, K. 2015.



Fotografía 24: Placas de *E. coli*/coliformes de la muestra 2 (chorro) seleccionadas para realizar los repiques.

Fuente: JACHO, K. 2015.



Fotografía 25: Placas de Aerobios Totales de la muestra 2 (chorro) seleccionadas para realizar los repiques.

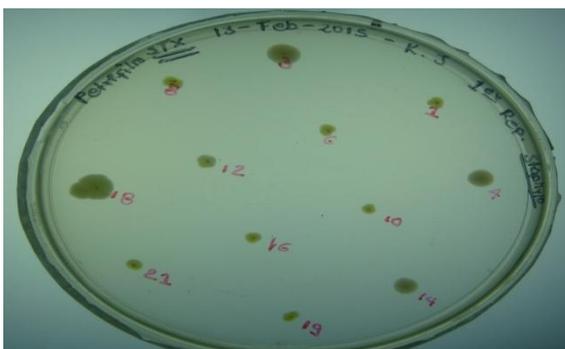
Fuente: JACHO, K. 2015.



Fotografía 26: Placas de Miuller Hinton de la muestra 1 (fuente) seleccionadas para realizar los repiques.

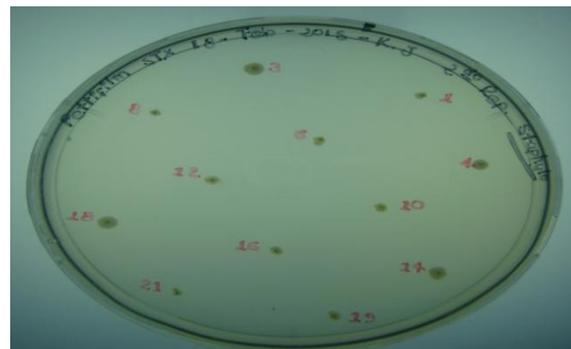
Fuente: JACHO, K. 2015.

ANEXO I: Repique de clones seleccionados



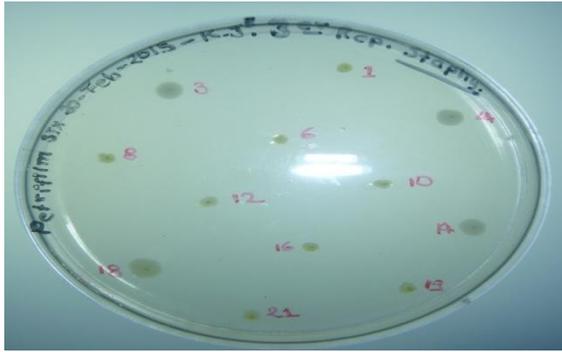
Fotografía 27: Repique 1 de clones aislados del Petrifil Staph Express.

Fuente: JACHO, K. 2015.

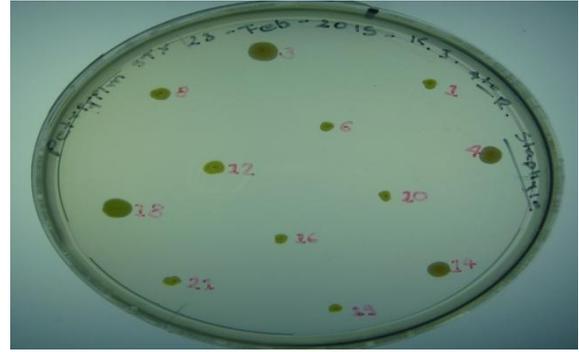


Fotografía 28: Repique 2 de clones aislados del Petrifil Staph Express.

Fuente: JACHO, K. 2015.



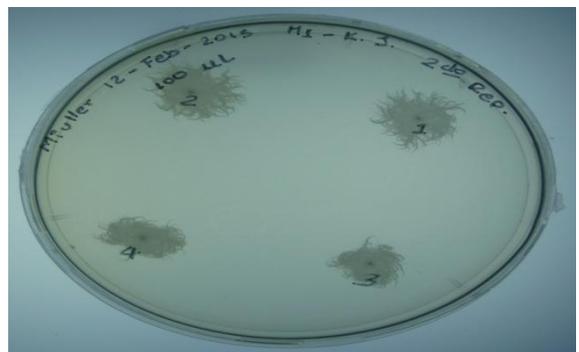
Fotografía 29: Repique 3 de clones aislados del Petrifil Staph Express.
Fuente: JACHO, K. 2015.



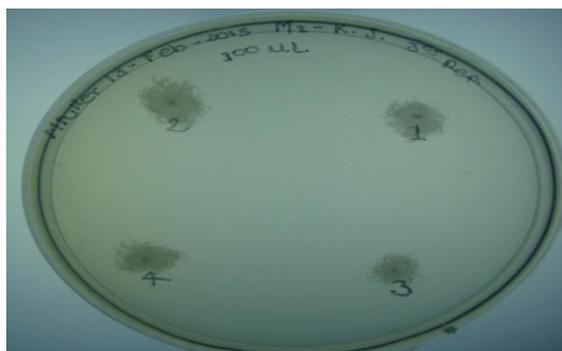
Fotografía 30: Repique 4 de clones aislados del Petrifil Staph Express.
Fuente: JACHO, K. 2015.



Fotografía 31: Repique 1 del clon aislado de la placa de Mueller Hinton dilución 100 μ L.
Fuente: JACHO, K. 2015.



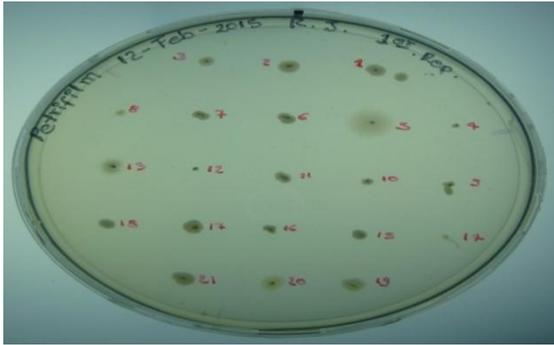
Fotografía 32: Repique 2 del clon aislado de la placa de Mueller Hinton dilución 100 μ L.
Fuente: JACHO, K. 2015.



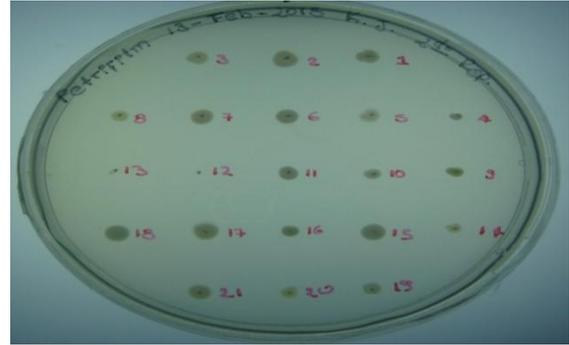
Fotografía 33: Repique 3 del clon aislado de la placa de Mueller Hinton dilución 100 μ L.
Fuente: JACHO, K. 2015.



Fotografía 34: Repique 4 del clon aislado de la placa de Mueller Hinton dilución 100 μ L.
Fuente: JACHO, K. 2015.



Fotografía 35: Repique 1 de los clones aislados de los Petrifil *E. coli*/coliformes y Aerobios Totales.
Fuente: JACHO, K. 2015.

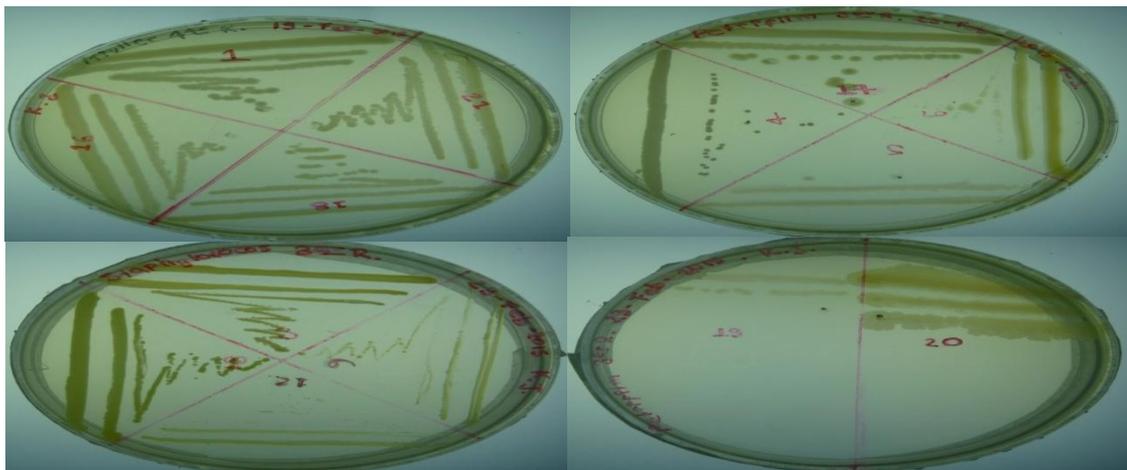


Fotografía 36: Repique 2 de los clones aislados de los Petrifil *E. coli*/coliformes y Aerobios Totales.
Fuente: JACHO, K. 2015.



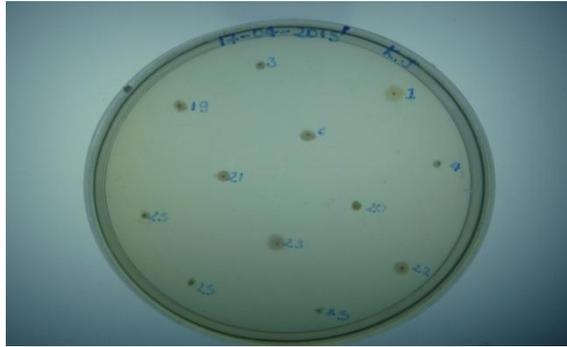
Fotografía 37: Repique 3 de los clones aislados de los Petrifil *E. coli*/coliformes y Aerobios Totales.
Fuente: JACHO, K. 2015.

ANEXO J: Estrías de las clones aislados



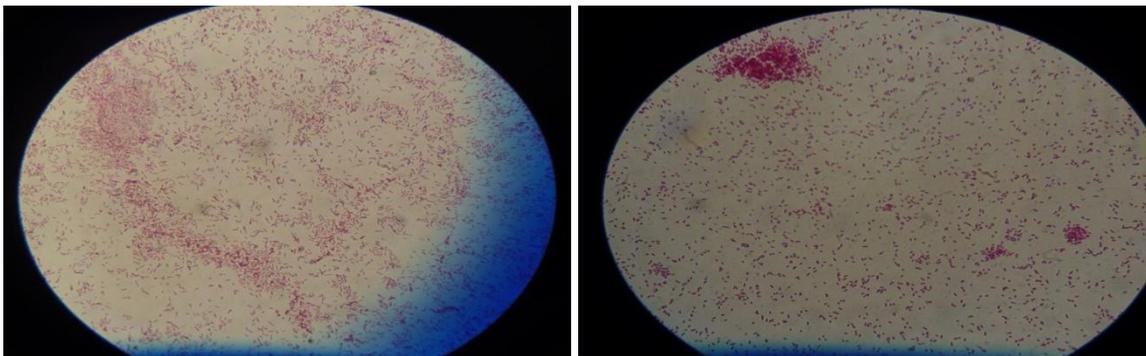
Fotografía 38: Estrías de clones aislados
Fuente: JACHO, K. 2015.

ANEXO K: Clones aislados puros

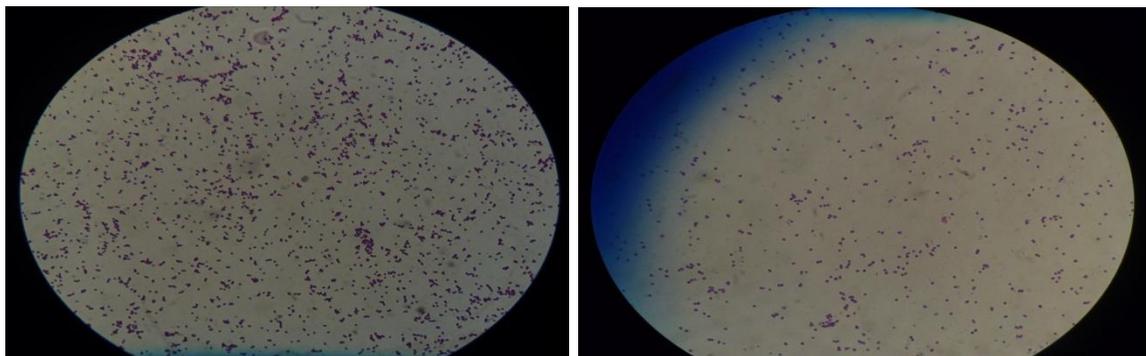


Fotografía 39: Clones aislados puros
Fuente: JACHO, K. 2015.

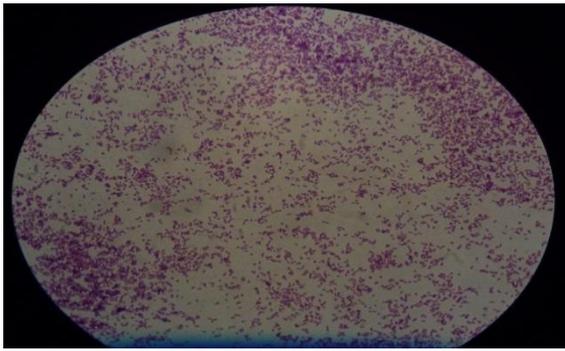
ANEXO L: Tinción Gram de clones aislados puros



Fotografía 40: Bacilos Gram negativos
Fuente: JACHO, K. 2015.

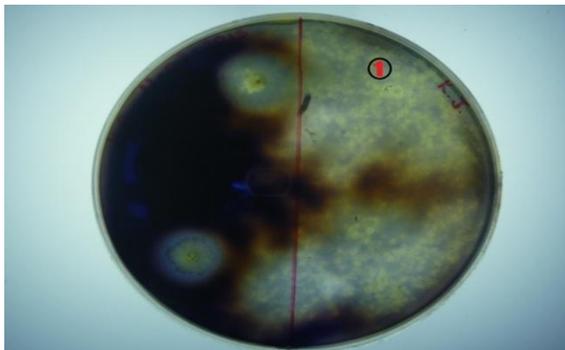


Fotografía 41: Cocos Gram positivos
Fuente: JACHO, K. 2015.

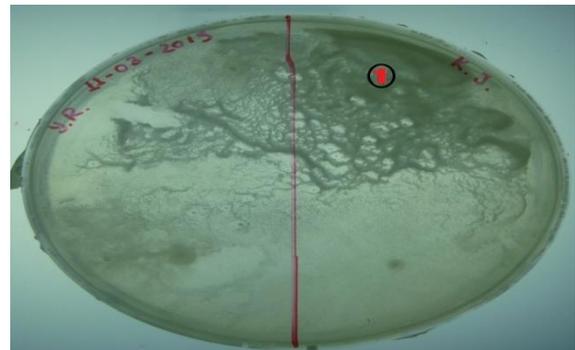


Fotografía 42: Bacilos Gram positivos
Fuente: JACHO, K. 2015.

ANEXO M: Pruebas de identificación de Bacilos Gram positivos



Fotografía 43: Prueba positiva para hidrólisis de almidón (formación de un halo).
Fuente: JACHO, K. 2015.

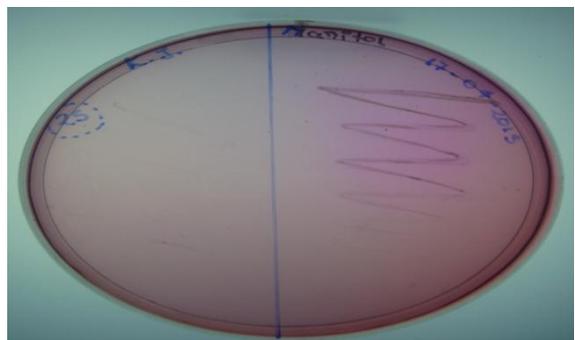


Fotografía 44: Prueba negativa para hidrólisis de gelatina.
Fuente: JACHO, K. 2015.

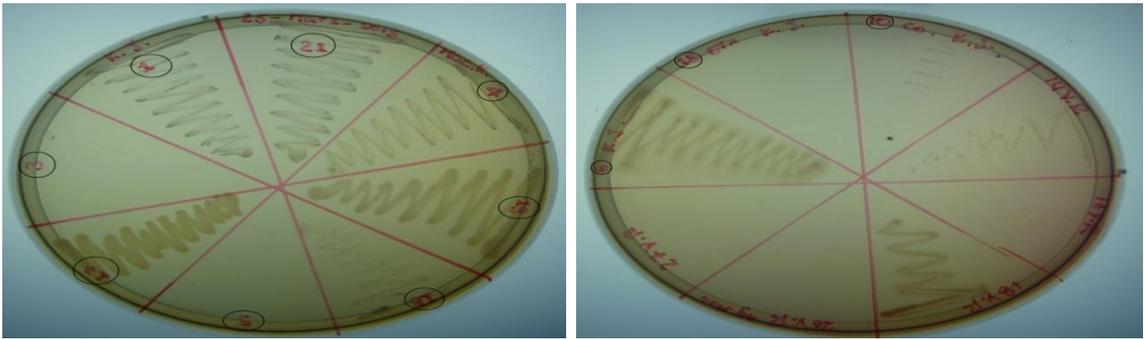
ANEXO N: Prueba de identificación de Cocos Gram Positivos



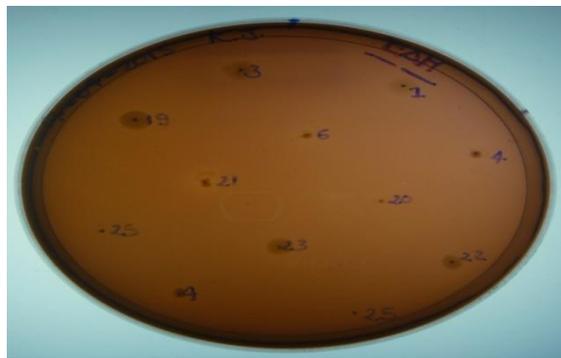
Fotografía 45: Crecimiento en agar Manitol Salado
Fuente: JACHO, K. 2015.



ANEXO O: Pruebas de identificación de Bacilos Gram negativos

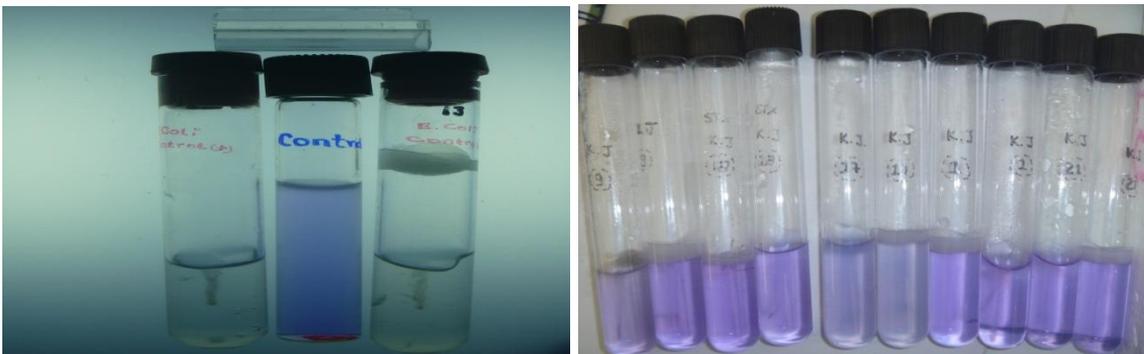


Fotografía 46: Crecimiento en Mac Conkey
Fuente: JACHO, K. 2015.



Fotografía 47: Crecimiento en Eosina Azul de Metileno
Fuente: JACHO, K. 2015

ANEXO P: Pruebas bioquímicas de Bacilos Gram negativos



Fotografía 48: Resultados en agar OF
Fuente: JACHO, K. 2015.



Fotografía 49: Resultados de la prueba Kligler.
Fuente: JACHO, K. 2015.



Fotografía 50: Resultados de la prueba SIM (Sulfhídrico-Indol-Movilidad).
Fuente: JACHO, K. 2015.



Fotografía 51: Resultados de la prueba Citrato.
Fuente: JACHO, K. 2015



Fotografía 52: Resultados de la prueba Ureasa.
Fuente: JACHO, K. 2015

ANEXO Q: Sistema multipuebas MICROGEN™ GN-ID

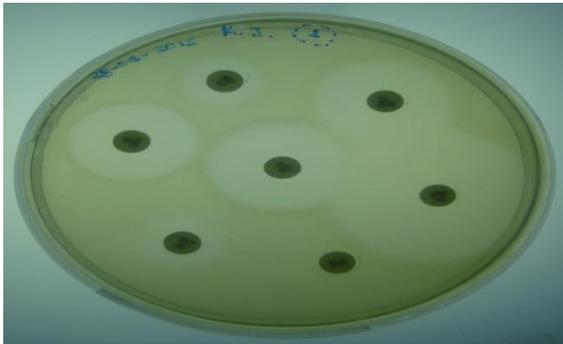


Fotografía 53: Resultados de la tira A de la galería MICROGEN™ GN-ID.
Fuente: JACHO, K. 2015.

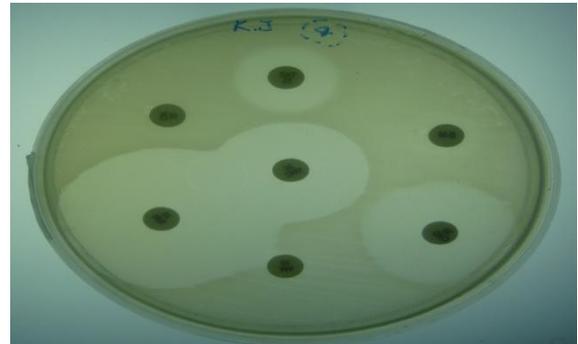


Fotografía 54: Resultados de la tira B de la galería MICROGEN™ GN-ID.
Fuente: JACHO, K. 2015.

ANEXO R: Antibiograma de las especies identificadas



Fotografía 55: *Xenorhabdus beddingii*
Fuente: JACHO, K. 2015.



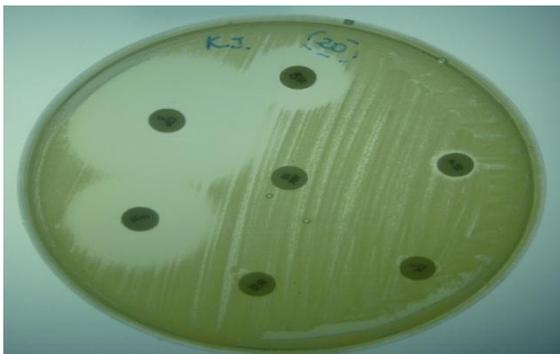
Fotografía 56: *Pseudomonas stutzeri*
Fuente: JACHO, K. 2015.



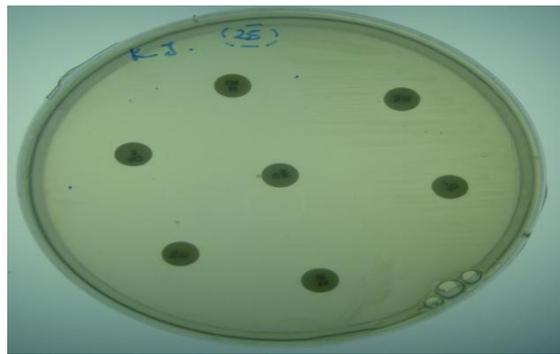
Fotografía 57: *Brevundimonas diminuta*
Fuente: JACHO, K. 2015.



Fotografía 58: *Budvicia aquatica*
Fuente: JACHO, K. 2015.



Fotografía 59: *Bacillus* spp.
Fuente: JACHO, K. 2015.



Fotografía 60: *Staphylococcus* spp.
Fuente: JACHO, K. 2015.

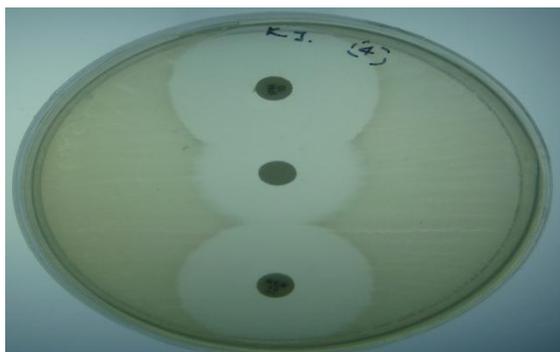


Fotografía 61: *Bacillus mycoides*
Fuente: JACHO, K. 2015.

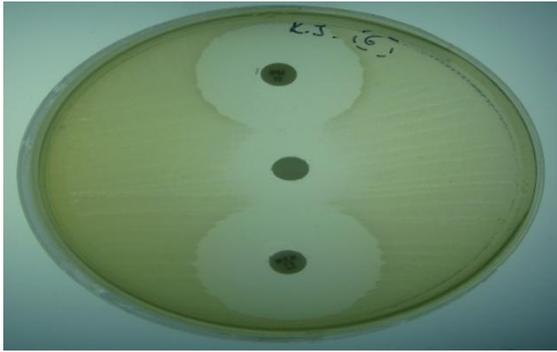
ANEXO S: Antibiograma con EDTA



Fotografía 62: Fenotipos de resistencia de *Xenorhabdus beddingii*.
Fuente: JACHO, K. 2015.



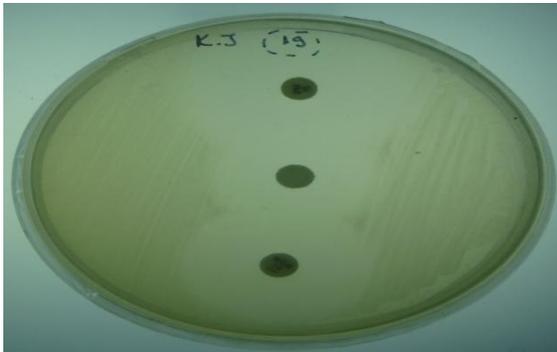
Fotografía 63: Fenotipos de resistencia de *Pseudomonas stutzeri*.
Fuente: JACHO, K. 2015.



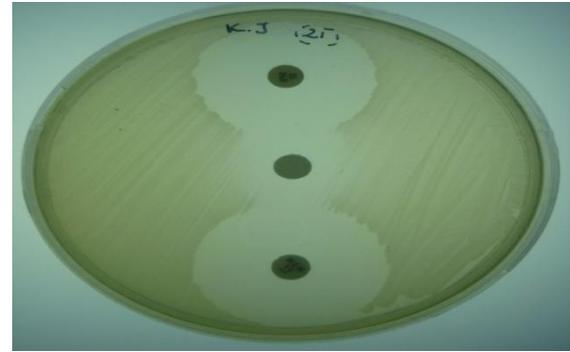
Fotografía 64: Fenotipos de resistencia de *Brevundimonas diminuta*.
Fuente: JACHO, K. 2015.



Fotografía 65: Fenotipos de resistencia de *Xenorhabdus beddingii*.
Fuente: JACHO, K. 2015.



Fotografía 66: Fenotipos de resistencia de *Budvicia aquatica*.
Fuente: JACHO, K. 2015.



Fotografía 67: Fenotipos de resistencia de *Brevundimonas diminuta*.
Fuente: JACHO, K. 2015.