



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUIMICA Y FARMACIA

**“ESTUDIO MICROBIOLÓGICO DE LAS AGUAS TERMALES
REINA DEL ROSARIO DE CUNUNYACU, PARROQUIA PILAHUIN-
TUNGURAHUA”**

Trabajo de titulación presentado para optar al grado académico de:

“BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO”

AUTOR: MARÍA FERNANDA PAMBABAY NARANJO

TUTOR: DRA. SANDRA ESCOBAR

Riobamba – Ecuador

2015

ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOQUIMICA Y FARMACIA

El tribunal de Tesis certifica que: El trabajo de investigación: ESTUDIO MICROBIOLÓGICO DE LAS AGUAS TERMALES REINA DEL ROSARIO DE CUNUNYACU, PARROQUIA PILAHUIN, PROVINCIA TUNGURAHUA, de responsabilidad de la señorita María Fernanda Pambabay Naranjo, he sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

Dra. Sandra Escobar

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Gerardo Medina

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Dr. Félix Andueza

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

DOCUMENTALISTA

SISBIB ESPOCH

Yo, María Fernanda Pambabay Naranjo 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.

MARÍA FERNANDA PAMBABAY NARANJO

DEDICATORIA

Dedico mi trabajo de tesis a mi mamá Mirian Pambabay por ser el modelo de lucha, sacrificio y por haberme brindado su apoyo incondicional desde que empezó mi vida estudiantil; a mis abuelitos Alberto y Fabiola por ser el ejemplo para mi formación personal, a mis tíos, primos y hermana por siempre estar pendientes y brindándome su cariño en todos los momentos de mi vida, a mi querido hijo Matías Alejandro por que llego a vida en el momento indicado para convertirse no solo en mi compañerito de tesis sino también en mi motivación para alcanzar esta meta.

Fernanda

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por la vida y todas las bendiciones recibidas, a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo y la Escuela de Bioquímica y Farmacia por abrirme las puertas hacia el conocimiento y un agradecimiento especial a la Dra. Sandra Escobar, al Dr. Gerardo Medina y al Dr. Félix Andueza por haber dedicado su tiempo para ser los guías del presente trabajo y de esta manera ayudarme a culminar esta etapa tan importante en mi vida.

Fernanda

TABLA DE CONTENIDOS

Contenido	Páginas
RESUMEN	xi
SUMMARY	xii
INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO I	3
1 MARCO TEORICO	3
1.1 Bases de la Microbiología	3
1.1.1 Microbiología	3
1.1.1.1 Virus	3
1.1.1.2 Hongos	3
1.1.1.3 Parásitos	4
1.1.1.4 Bacterias	4
1.1.2 Identificación bacteriana	8
1.1.2.1 Placas Petrifilm	9
1.1.2.2 Medios de Cultivo	10
1.2 Aguas termales y sus aplicaciones terapéuticas	22
1.2.1 Definiciones	22
1.2.1.1 Agua natural	22
1.2.1.2 Agua mineral natural	22
1.2.1.3 Agua salina	22
1.2.2 Hidroterapia	22
1.2.3 Principios mecánicos de agua	22
1.2.4 Principios térmicos del agua	23
1.2.5 Aguas termales	23
1.2.5.1 Clasificación de las aguas termales	23
1.2.5.2 pH y efectos según la composición química de las aguas termales	24

1.2.5.3	<i>Usos terapéuticos de las aguas termales</i>	24
1.2.5.4	<i>Microbiota de las aguas termales</i>	25
1.2.5.5	<i>Aguas termales Reina del Rosario de Cununyacu</i>	25
CAPITULO II		28
2.	MARCO METODOLOGÍCO	28
2.1	Población de estudio y localización de muestreo	28
2.2	Ubicación de las Aguas termales Reina del Rosario de Cununyacu	28
2.3	Metodología	28
2.3.1	<i>Muestreo</i>	28
2.3.2	<i>Siembra en Petrifilm para el recuento de E. coli/ Coliformes</i>	28
2.3.3	<i>Siembra en Petrifilm Sistema de Recuento Staph Express</i>	29
2.3.4	<i>Siembra en Petrifilm para el recuento de aerobios</i>	30
2.3.5	<i>Siembra en Petrifilm para el recuento de Mohos y Levaduras</i>	30
2.3.6	<i>Repiques en Mueller Hinton</i>	32
2.3.7	<i>Tinción Gram</i>	32
2.3.8	<i>Prueba de la catalasa</i>	33
2.3.9	<i>Prueba de la oxidasa</i>	33
2.3.10	<i>Prueba de la oxidación y fermentación O/F</i>	34
2.3.11	<i>Prueba del almidón</i>	34
2.3.12	<i>Prueba de la gelatina</i>	35
2.3.13	<i>Kligler</i>	35
2.3.14	<i>Citrato</i>	36
2.3.15	<i>SIM</i>	36
2.3.16	<i>Urea</i>	37
2.4	Esquemas de identificación de las bacterias aisladas	38
2.4.1	<i>Esquema de identificación del clon aislado del género Bacillus</i>	39

2.4.2	<i>Esquema de identificación del clon aislado del género y especie Proteus vulgaris</i>	40
2.4.3	<i>Esquema de identificación de los clones aislados Providencia rettgeri</i>	41
2.4.4	<i>Esquema de identificación del clon aislado del género y especie Escherichia coli</i>	42
2.4.5	<i>Esquema de identificación del clon aislado del género Staphylococcus</i>	43
CAPITULO III		44
3.	MARCO DE ANALISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	44
3.1	Recuento de bacterias Aerobias mesófilas	43
3.2	Recuento de bacterias coliformes fecales y totales	45
3.3	Recuento de <i>Staphylococcus</i>	47
3.4	Recuento de mohos y levaduras	48
3.5	Porcentaje de bacterias Gram (+) y de Gram (-)	49
3.6	Número de bacterias fermentadoras, oxidativas e inertes	51
3.7	Mediciones de los parámetros físico- químicos	52
3.8	Pruebas realizadas a las bacterias Gram (-)	53
3.9	Pruebas realizadas a las bacterias Gram (+)	54
3.10	Bacterias aisladas	55
CONCLUSIONES		57
RECOMENDACIONES		58
BIBLIOGRAFIA		
ANEXOS		

ÍNDICE DE CUADROS Y TABLAS

Cuadro 1-1	Diferencias entre bacterias Gram positivas y Gram negativas.....	7
Cuadro 2-1	Interpretación de los resultados de la Prueba de oxidación y fermentación.....	13
Cuadro 3-1	Interpretación de los resultados de la prueba de la glucosa y lactosa.....	15
Cuadro 4-1	Interpretación de los resultados de la prueba del citrato.....	16
Cuadro 5-1	Interpretación de los resultados de la prueba del Sulfuro Indol y Movilidad.....	17
Cuadro 6-1	Interpretación de los resultados de la prueba de la ureasa.....	19
Cuadro 7-1	Interpretación de los resultados de la prueba del almidón.....	20
Cuadro 8-1	Interpretación de los resultados de la prueba de la gelatina.....	20
Cuadro 9-1	Características para la diferenciación de especies de la familia enterobacteriaceae....	21
Tabla 1-3	Recuento de bacterias Aerobias Mesófilas.....	44
Tabla 2-3	Número de bacterias coliformes totales y fecales.....	45
Tabla 3-3	Número de <i>Staphylococcus</i>	47
Tabla 4-3	Número de Mohos y Levaduras.....	48
Tabla 5-3	Porcentaje de bacterias Gram (+) y de Gram (-).....	49
Tabla 6-3	Número de bacterias fermentadoras, oxidativas e inertes.....	51
Tabla 7-3	Parámetros físico-químicos medidos en las Aguas termales Reina del Rosario de Cununyacu	52
Tabla 8-3	Pruebas realizadas a las bacterias Gram (-).....	53
Tabla 9-3	Pruebas realizadas a las bacterias Gram (+).....	54
Tabla 10-3	Bacterias aisladas.....	55

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1-1 Formas y agrupaciones de los bacilos.....	4
Figura 2-1 Formas y agrupaciones de los cocos.....	5
Figura 3-1 Formas incurvadas o espiraladas.....	6
Figura 4-1 Formas de nutrición de las bacterias.....	8
Figura 5-1 Interpretación de la prueba de Oxidación/Fermentación.....	13
Figura 6-1 Interpretación de la prueba Kligler	14
Figura 7-1 Interpretación de los resultados de la prueba del citrato.....	16
Figura 8-1 Interpretación de la prueba de la ureasa.....	18
Figura 9-1 Interpretación de la prueba de la prueba hidrolisis de almidón.....	19
Gráfica 1-3 Recuento de bacterias Aerobias Mesófilas.....	44
Gráfica 2-3 Recuento de bacterias coliformes totales y fecales.....	46
Gráfica 3-3 Recuento de <i>Staphylococcus</i>	47
Gráfica 4-3 Recuento de mohos y levaduras.....	48
Gráfica 5-3 Porcentaje de bacterias Gram (+) y de Gram (-).....	50
Gráfica 6-3 Número de bacterias fermentadoras, oxidativas e inertes.....	51

RESÚMEN

Las aguas termales Reina del Rosario de Cununyacu, no cuentan con un análisis microbiológico, para ello se realizó el estudio de la microbiota autóctona y alóctona, a través de la siembra en las Placas 3M™ Petrifilm y las pruebas de identificación microbiana. La microbiota autóctona fue analizada tomando muestras del ojo de agua, el resultado de este análisis fue el crecimiento de 1 UFC/ml perteneciente al género *Bacillus*, para determinar si existe o no microorganismos producto de una contaminación (alóctonos) se estudiaron muestras de agua tomadas de una de las piscinas donde se encontraron microorganismos de interés sanitario como: *Escherichia coli* 12 UFC/ml, *Proteus vulgaris* 1 UFC/ml, *Providencia rettgeri* 2 UFC/ml y 325 UFC/ml colonias del género *Staphylococcus*. Además de analizar la presencia de bacterias también se determinó que en el ojo de agua no existe presencia de mohos y levaduras, mientras que en una de las piscinas hubo crecimiento de estos dos tipos de microorganismos. Dentro del análisis microbiológico también se determinó el porcentaje de bacterias Gram (+) y de Gram (-) que habitan en estas termas resultando en mayor porcentaje las bacterias Gram (-) con un 66.67% y en menor cantidad las bacterias Gram (+) con un 33.33%. Para complementar el estudio se realizaron mediciones in situ del pH, temperatura, conductividad y sólidos totales; las mediciones de estos parámetros se efectuó en el ojo de agua excepto de la temperatura que también fue tomada de la piscina de la cual se realizaría el estudio. Los resultados fueron: pH es 7.8, 40°C ,4519 $\mu\text{s/cm}$ de conductividad y 2892.16 ppm se sólidos totales para el ojo de agua y 36.4°C para la piscina; con estos datos se concluye que se hace necesario adoptar medidas de control microbiológico e higiénico- sanitarias que brinden a sus usuarios bienestar y eviten patologías en la salud.

PALABRAS CLAVES: <AGUAS TERMALES>, <ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO>, <MICROBIOTA AUTÓCTONA>, <MICROBIOTA ALÓCTONA>, <UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS [UFC]>.

SUMMARY

Reina del Rosario de Cununyacu hot springs do not have a microbiological analysis, for this reason it was necessary to carry out a native and non-native microbiota study through the sowing in 3M™ Petrifilm plates as well as tests to identify microbes. The native microbiota was analyzed taking water samples resulting in the growing of 1 CFU/ml belonging to *Bacillus*, in order to determine the existence of non-native microorganisms causing the contamination, some water samples taken from the pool were analyzed, as a result some relevant microorganisms for sanitation such as: *Escherichia coli* 12 CFU/ml, *Proteus vulgaris* 1 CFU/ml, *Providencia rettgeri* 2 CFU/ml, and colonies of *Staphylococcus* 325 CFU/ml were found. Apart from analyzing the presence of bacteria, it was also determined that the waterhole does not show the presence of molds and yeasts, while in one of the pools there was growth of these two types of microorganisms.

Within the microbiological analysis the (+) and (-) Gram bacteria percentage living in these hot springs was also determined, this analysis resulted in a higher percentage of (-) Gram bacteria with 66.67% and a lower percentage of (+) Gram bacteria with 33.33%. To complement the study some in situ measurements for pH, temperature, conductivity, and total solids were carried out; the measurements of these parameters were carried out in the waterhole, except for the temperature that was taken from the pool where the analysis was done. The results were: pH is 7.8, 40°C, 4519 µs/cm of conductivity and 2892.16 ppm of total solids for the waterhole and 36.4°C for pool; with this data it is concluded that it is necessary to adopt microbiologic and sanitary control measurements providing its user welfare and avoiding health pathologies.

KEY WORDS: <HOT SPRINGS>, <MICROBIOLOGICAL ANALYSIS>, <NATIVE MICROBIOTA>, <NON-NATIVE MICROBIOTA>, <COLONY FORMING UNITS [UFC]>.

INTRODUCCIÓN

El uso de las aguas termales se remota varios años atrás; tal es así, que los Etruscos (750 a.C) un pueblo de la antigüedad de Italia realizaban curaciones con estas aguas dentro de los templos, pues eran considerados lugares aptos para estas actividades; más tarde las terapias con agua se introdujeron en Roma, donde las aguas ya fueron clasificadas según el tipo de minerales que contenían. (Lagarto y Bernal, 2002). En nuestro país el uso de estas aguas también tiene sus inicios en la antigüedad, los Chasquis en su largo trayecto de mensajeros entre el Cuzco y Quito siempre descansaban en un tambo cerca de Azogues, aquí sumergían los pies en una vertiente de aguas termales denominada Opar-Chaquimaillanayacu” (Paladines, 2011)

Como ya lo mencionamos anteriormente; desde la antigüedad las aguas termales fueron usadas con fines terapéuticos, pese a ignorar el porqué de sus beneficios. En los últimos siglos la necesidad de saber cómo actúan estas aguas sobre el organismo humano ha llevado a varios investigadores a estudiar la composición de las mismas. En Madrid en la facultad de farmacia se estudió la diversidad de microorganismos en las aguas termales, llegando a la conclusión que: existen bacterias heterótrofas, es decir bacterias incapaces de formar materia orgánica, oligotrófas, bacterias que sobreviven en ambiente de baja concentración de nutrientes y bacterias autótrofas que son aquellas que elaboran su propia materia orgánica. (De la Rosa y Mosso). En Costa Rica se actualizaron nuevos parámetros microbiológicos que debe cumplir el agua en sus diferentes usos, entre ellos se estableció nuevos parámetros para las aguas de piscinas termales, indicando que el número de coliformes termoresistentes no debe sobre pasar las 240 UFC/ml y el número de *Clostridium perfringes* no debe exceder más allá de 100 UFC/ml. (Mora, 1998).

Los análisis de este recurso natural han ido aumentando en los últimos tiempos, tal es el caso que en Cuba se implanto un nuevo método para monitorear que las aguas termales cumplan con los requisitos sanitarios, se trata de un micrométodo que reemplaza al método estándar NMP índice de coli, este micrométodo es más factible, se requiere de menor tiempo y se obtienen los mismos resultados. (Soto y Col). En España analizaron agua de consumo humano proveniente de una fuente termal, los resultados fueron: presencia de coliformes fecales, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, entre otros; lo que determinó que el agua proveniente de la fuente termal del Tinteiro no es potable por lo tanto no es apta para el consumo humano. (Torres, et al, 1998).

En el vecino país, Perú, se aislaron bacterias halotolerantes productoras de hidrolasas, las mismas que soportan temperaturas y pH extremos lo que constituyen una alternativa en el campo de la biotecnología, así por ejemplo la halotolerancia de las bacterias es muy importante para disminuir la contaminación durante el proceso de fermentación. (Borja y Col, 2012). En Ecuador se han registrado

167 fuentes de aguas minerales y termales, de las cuales 68 aún no han sido estudiadas (Paladines, 2011)); las restantes tienen estudios solo de su composición química, es por ello que como profesionales de la salud estamos interesados en complementar las investigaciones de estas aguas realizando el análisis microbiológicos, para de esta manera tener la garantía total de que estas aguas son aptas para estar en contacto con el organismo humano.

Las aguas termales al proceder de la tierra gozan de varios componentes, los mismos que ejercen una acción terapéutica una vez que el cuerpo humano ingresa en ellas; muchas personas se dedicaron hacer análisis de las mismas, siendo el análisis microbiológico es una de las pruebas más importantes que se realizaron, pues, como son aguas de uso humano, el control sanitario es un requisito indispensable para evitar cualquier inconveniente con la salud de las personas que ahí acuden.

Uno de los principales objetivos de la carrera de Bioquímica y Farmacia, es mejorar la calidad de vida de las personas; objetivo que contribuye a fortalecer el plan del buen vivir. Este plan busca mejorar la calidad de vida de las personas a través del derecho a la salud (art. 32), el mismo que se fundamenta en la prevención de enfermedades. Estudiantes de la ESPOCH, egresados de Bioquímica y farmacia, seremos los encargados de analizar la calidad microbiológica y a su vez la diversidad de microorganismos que existen en un conjunto de aguas termales del Ecuador.

Con la realización de los análisis microbiológicos se espera encontrar los microorganismos perjudiciales con la salud de las personas y porque no, microorganismos propios de este sector que aún no han sido estudiados, quedando abierta la posibilidad de estudiarlos más a fondo para determinar si gozan o no de propiedades beneficiosas; de esta manera las personas con problemas de dolores de huesos, articulaciones, músculos o las personas que hacen rehabilitaciones en estas aguas se verán beneficiadas con este estudio. Además, si las personas que requieren de estas aguas para mejorar su salud se ven satisfechas de su poder terapéutico y su calidad sanitaria, no dudarían en sugerir a otras personas su uso, de tal manera que no solo se beneficiara a las personas con las patologías dichas anteriormente, si no también, la parroquia Pilahuin, ya que las aguas termales Reina del Rosario de Cununyacu constituyen su principal atractivo.

Para garantizar el análisis microbiológico de las aguas termales, se realizara con una metodología establecida internacionalmente, bajo la supervisión de personas especializadas en este tema y con las más altas normas de seguridad.

CAPITULO I

1. MARCO TEORICO

1.1 Bases de la microbiología

1.1.1 Microbiología

Según sus raíces griegas: mikron –pequeño, bios-vida y logos- tratado o estudio; la microbiología se define como el estudio de organismos microscópicos; pero para referirnos al ámbito sanitario este concepto se amplía como la ciencia que estudia los microorganismos capaces de producir alteraciones en el huésped que invaden. (De la Rosa, et al, 2011).

Cuando habla de microorganismos De la Rosa se está refiriendo a esos seres diminutos causantes de tantas enfermedades como son los virus, hongos, parásitos y bacterias. La aparición de estos se remota billones de años atrás, lo que quiere decir que debieron pasar por muchos cambios para que en la actualidad sigan existiendo; la aceptación a estos cambios ha hecho que los microorganismos tengan varios habitad como: agua, tierra, vegetales, animales y humanos. (Negroni, 2009)

1.1.1.1 *Virus*.- Son los seres más pequeños que pueden existir, están formados por un solo tipo de material genético (ADN o ARN) que es el responsable de actuar de manera intracelular en las células del huésped. (De la Rosa, et al, 2011)

1.1.1.2 *Hongos*.- En este grupo encontramos mohos, levaduras y setas, su reproducción la realizan a través de esporas. Debido a su semejanza con las plantas, antiguamente se clasificaba a los hongos en este grupo, pero con estudios posteriores se determinó que no era así, pues las plantas en su pared celular contienen celulosa y los hongos quitina. Los hongos pueden causar infecciones tanto a humanos, animales y plantas; pero no todos son perjudiciales como es el caso de las levaduras que son las encargadas de la fermentación de la cerveza y el pan; otro beneficio de estos organismos eucariotas es la obtención de antibióticos y enzimas.

1.1.1.3 *Parásitos*.- Este término se emplea para referirse a los protozoos y organismos pluricelulares fácilmente reconocibles al lente del microscopio. (De la Rosa, et al, 2011)

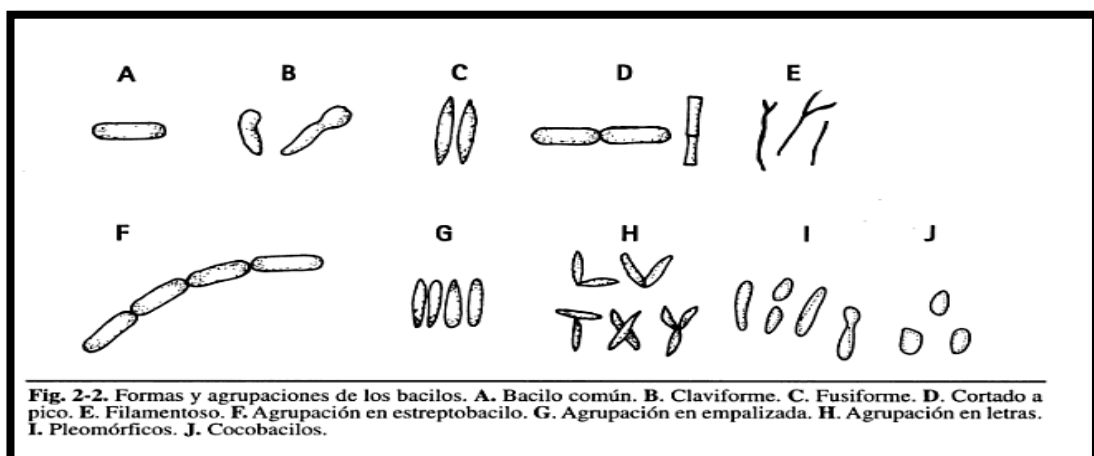
1.1.1.4 *Bacterias*.- Las bacterias son células procariotas que al igual que las células eucariotas están compuestas por ácidos nucleicos, lípidos, proteínas e hidratos de carbono; pero existen diferencias entre estas células. Las células procariotas carecen de orgánulos, además la estructura de sus paredes y membranas celulares no es igual. (Tortora, et al, 2007)

Agrupaciones y formas de las bacterias

Según su forma y como se distribuyan, las bacterias van tomando sus diferentes nombres; en algunos casos su manera de reproducirse que es la fisión binaria o división simple dan origen a las diferentes agrupaciones. (Negroni, 2009).

Bacilos.- Nombre que proviene del latín *bacillus*, que quiere decir: bastón, esta denominación reciben las bacterias que son alargadas. Existen bacilos con terminaciones redondeadas, afiladas y abultadas; otros que tienen ramificaciones, a los que se los nombra como filamentosos; los bacilos con las terminaciones redondeadas y no tan alargados podrían ser confundidos con cocos, pero a esta morfología se la conoce como cocobacilos. Cuando los bacilos se agrupan linealmente se denominan estreptobacilos, pero no siempre la agrupación es lineal, muchas veces estos microorganismo forman estructuras similares a las letras L, V, T, X, Y. (Negroni, 2009).

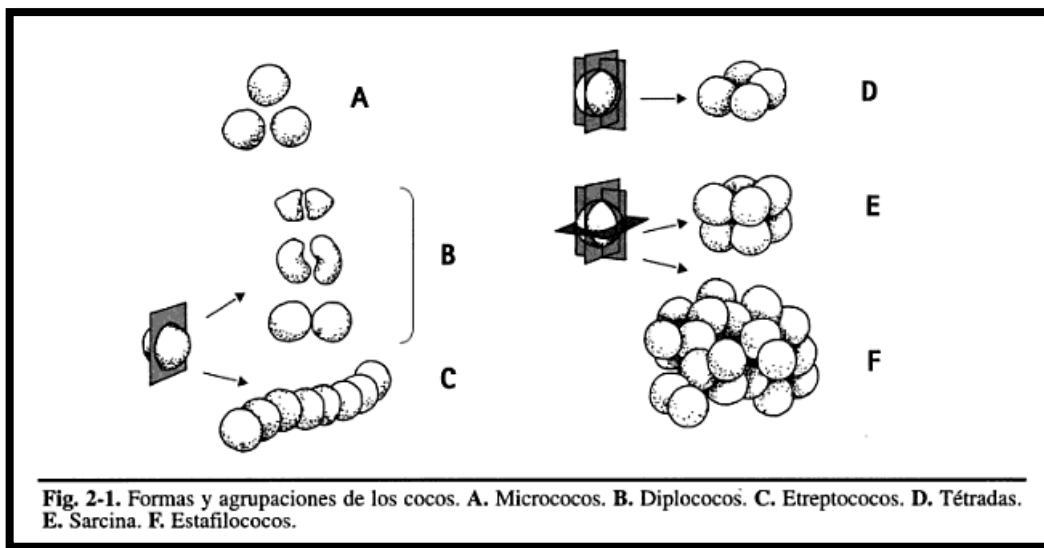
Figura 1-1 Formas y agrupaciones de los bacilos



Fuente: Marta Negroni

Cocos.- Al hablar de cocos se nos viene a la mente que la forma de estos organismos es redonda, lo cual es cierto, pero se diferencian unos de otros debido a las agrupaciones que forman; si son cocos solos se denominan *micrococos*; *diplococos* se originan cuando en la división de estos microorganismo quedan unidos dos elementos; si en la división quedan reunidos tres o más cocos en forma de cadenas se los denomina *estreptococos*, todas estas divisiones se dan en un solo plano pero existe un grupo de estos que no lo hace así, a estos se los llama estafilococos, su agrupación es similar a un racimo de uvas. (Negroni, 2009).

Figura. 2-1 Formas y agrupaciones de los cocos



Fuente: Marta Negroni

Espirales.- Estas se clasifican y toman su nombre de acuerdo a las curvaturas y filamentos que poseen. (Negroni, 2009).

Vibrio.- Microorganismo con una sola curvatura en forma de coma. (Negroni, 2009).

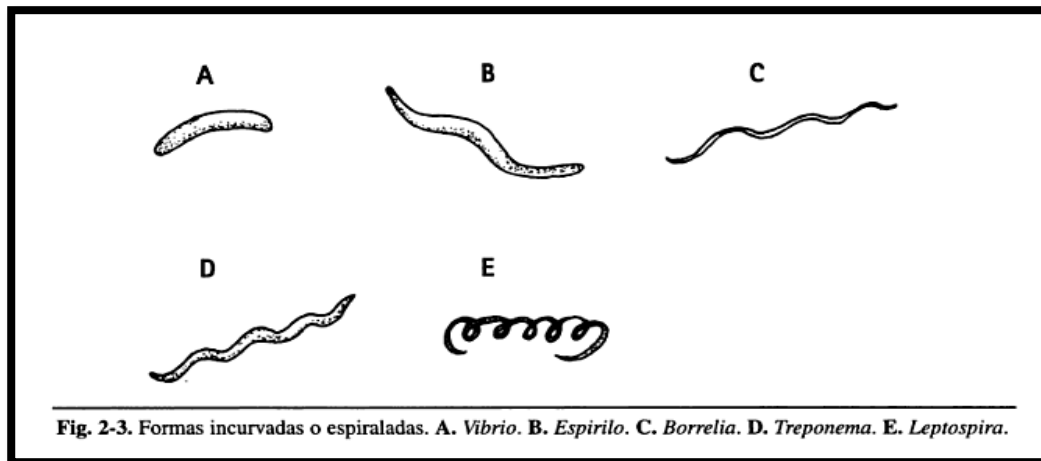
Espirilo.- Microorganismo con dos curvas en forma de S. (Negroni, 2009).

Borrelia.- Microorganismo con más de dos curvaturas amplias. (Negroni, 2009).

Treponema.- Microorganismo con más de dos curvaturas estrechas. (Negroni, 2009).

Leptospira.- Microorganismo con más de dos curvaturas estrechas y además de esto sus extremos son curvados hacia adentro. (Negroni, 2009).

Figura 3-1 Formas incurvadas o espiraladas



Fuente: Marta Negroni

Clasificación de las bacterias y Tinción Gram

Las bacterias se clasifican en función al color que toman frente a la tinción Gram; son Gram + las que se tiñen de color violeta oscuro y Gram – las que se tiñen de color rosado. La tinción Gram es una secuencia de pasos que se usa para identificar las bacterias luego de haberlas fijado; este método está compuesto por cuatro reactivos cada uno con una función específica:

- Cristal violeta- colorante violeta
- Yodo – fijador de color
- Alcohol cetona – decolorante
- Safranina – colorante rojo rosa (De la Rosa, et al, 2011)

El mecanismo de acción de esta tinción se lleva a cabo en la pared celular de las bacterias; el cristal violeta tiñe el citoplasma tanto de bacterias Gram (+) como de las Gram (-), luego al adicionar el yodo, este forma cristales con el colorante los mismos que no pueden atravesar la pared celular; al añadir el decolorante, este deshidrata el peptidoglucano de las bacterias Gram (+) y las vuelve más impermeables a los cristales formados anteriormente; en el caso de las bacterias Gram (-) el alcohol crea orificios en la capa de peptidoglucano por donde ingresa la safranina y la bacteria se tiñe de un color característico. (Tortora, et al, 2007)

Bacterias Gram positivas

La pared celular de estas bacterias, que es la estructura que diferencia Gram (+) de Gram (-); es una estructura gruesa formada por muchas capas de peptidoglucano y ácidos teicoicos. La

composición química de los ácidos teicoicos es un alcohol y un fosfato, este último componente hace que estos ácidos tengan carga negativa por lo que les resulta fácil unirse a los cationes y regular el movimiento hacia el interior y exterior de las células. (Tortora, et al, 2007)

Bacterias Gram negativas

La pared celular de estas bacterias está compuesta por dos capas, una interna constituida por peptidoglucano y una externa formada por moléculas de lipopolisacáridos, sustancias tóxicas y responsables de las infecciones; la cantidad de peptidoglucano de estas bacterias es muy poco lo que hace que la célula sea susceptible a rupturas; además estas bacterias no contienen ácidos teicoicos. La membrana externa contiene unas proteínas llamadas porinas que son las que permiten el paso de nutrientes para el normal funcionamiento de la célula; pero esta no es la única función de membrana externa, está también actúa como barrera que impide el paso de ciertos antibióticos, enzimas y ciertos colorantes. (Tortora, et al, 2007)

Cuadro 1-1 Diferencias entre bacterias Gram positivas y Gram negativas

Característica	Gram (+)	Gram (-)
Tinción Gram	violeta	rojo-rosa
Pared celular	si	si
Peptidoglucano	capa gruesa	capa fina
Ácido teicoico	presente	Ausente
Lipopolisacáridos	ausente	Presente
Espacio periplásmico	ausente	Presente
Susceptibilidad a lisozima	alta	baja
Susceptibilidad a penicilina	alta	Baja
Producción de toxinas	exotoxinas	Endotoxinas

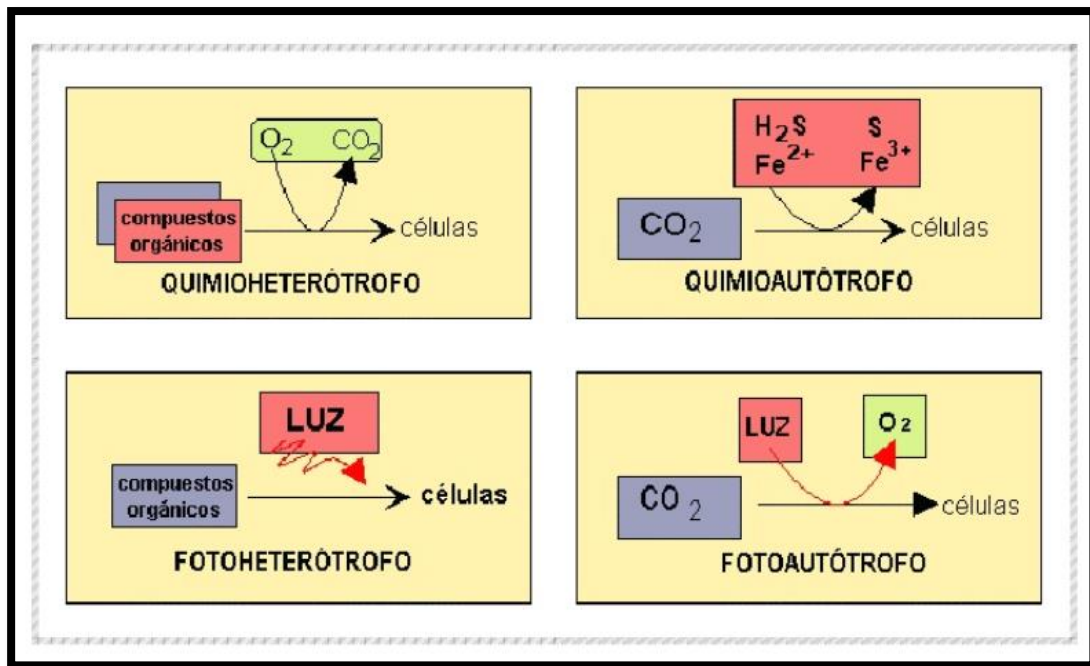
Fuente: Marta Negroni

Nutrición Bacteriana

La rápida adaptación de las bacterias a los distintos medios se debe a la facilidad de mutación, lo que no sería posible sin su gran versatilidad metabólica, es decir su manera de obtener materia y energía, en función a esto las bacterias pueden ser: (Bailón, et al, 2003)

- Quimioheterótrofas.- Estas bacterias utilizan un compuesto químico tanto como fuente de carbono y energía; la mayoría de bacterias patógenas pertenecen a este grupo.
- Quimioautótrofas.- Estas bacterias utilizan el CO_2 como fuente de carbono y compuestos inorgánicos como fuentes de energía.
- Fotoautótrofas.- Estas bacterias utilizan el CO_2 como fuente de carbono y la luz como fuente de energía.
- Fotoheterótrofos.- Estas bacterias utilizan las biomoléculas como fuente de carbono y la luz como fuente de energía. (Bailón, et al, 2003)

Figura 4-1 Formas de nutrición de las bacterias



Fuente: Lucía Bailón

1.1.2 Identificación bacteriana

Para identificar los microorganismos, la microbiología ha estudiado y desarrollado las maneras de proporcionar los nutrientes y las condiciones necesarias para el crecimiento bacteriano, a través de pruebas de laboratorio que incluyen reacciones en medios de cultivo y pruebas rápidas; para llevar a cabo los ensayos ha sido necesario la obtención de colonias puras, es decir, grupos de bacterias

de una misma especie, cosa que no resulta tan fácil, pues los microorganismos se encuentran formando poblaciones mixtas. (Bailón, et al, 2003).

El primer paso que se sugiere para una identificación bacteriana es la observación de las características microscópicas en fresco, es decir, realizar una tinción a la muestra recién tomada para así tener un soporte provisional y una idea del microorganismo que puede ser. Luego de esto se realiza una observación macroscópica de las colonias, aquí se debe observar: el tamaño, la forma, los bordes, la consistencia y el color. Este paso se realiza luego de que las bacterias hayan crecido en algún medio de cultivo. En la actualidad no solo se cuentan con los medios de cultivo habituales que son los que requieren la preparación del analista, si no que ya existen medios que ahorran este tiempo y además son selectivos para algunos microorganismos. (Fernández, et al, 2010).

1.1.2.1 Placas Petrifilm

Las placas Petrifilm son medios de cultivo listos para sembrar las muestras, este método ha ganado rápidamente espacio en el área de los análisis microbiológicos debido a que su uso reduce tiempo, aumenta la productividad y en cierto modo disminuye errores humanos. Estos medios están constituidos por hule que evita que la muestra líquida se esparza, una lámina superior, un indicador químico (TTC – Cloruro de trifenil tetrazolio que pinta las colonias de color rojo), nutrientes y sustancias específicas que los hacen selectivos para ciertas bacterias. (3M, Petrifilm, 2014)

Placa Petrifilm para Recuento Aeróbico

Los petrifilm para aerobios contienen caldo MRS que favorece el crecimiento de lactobacilos, la incubación de este medio es anaeróbica lo que favorece al crecimiento de las bacterias ácido lácticas. La incubación es 30-32°C durante 48 horas. (3M, Petrifilm, 2014)

Placas Petrifilm E. coli/Coliformes

Estas placas además de tener los nutrientes de Bilis y Rojo Violeta (VRB) contiene un indicador de actividad de la glucuronidasa, aproximadamente el 97% de *E. coli* producen beta-glucuronidasa sustancia que reacciona con el indicador y produce un precipitado azul en las colonias. Los coliformes al fermentar la lactosa producen gas, el mismo que queda atrapado con la lámina superior del petrifilm. La incubación es: para coliformes: incubar 24h a 35°C y para *E. coli*: incubar 48h a 35 °C. (3M, Petrifilm, 2014)

Placas Petrifilm para Recuento Rápido de S. aureus

Placas Petrifilm para Recuento Rápido de *Staphylococcus aureus* o Staph Express está hecho con el medio Baird-Parker que es selectivo para estas bacterias, cuando las colonias crecen son de color rojo-violeta, pero en caso de presentarse colonias de otros colores se aplica el disco Petrifilm Staph Express para comprobar si se trata o no de *S. aureus*, el uso de este disco se fundamenta en la detección de las reacciones de desoxiribonucleasa que es específica en estos microorganismos; el disco ayuda a observar el color rosa que se forma en la reacción de desoxiribonucleasa. La incubación es 3h a 37°C. (3M, Petrifilm, 2014).

Placa Petrifilm para Recuento de Mohos y Levaduras

Para permitir el crecimiento de mohos y levaduras estas placas tienen componentes y condiciones distintas a las anteriores; los medios empleados como nutrientes son una combinación de agar glucosa de Sabouraud y el agar BHI (infusión cerebro-corazón, “brain-heart”), además contienen dos antibióticos el cloranfenicol y la clorotetraciclina que impiden el crecimiento de las bacterias, el indicador de fosfatos tiñe las levaduras. La incubación es a 25°C durante 8 días. (3M, Petrifilm, 2014)

1.1.2.2 Medios de cultivo

Los medios de cultivo son mezclas de varios componentes que en conjunto crean un hábitat artificial para el crecimiento de las bacterias; estos componentes juegan un papel muy importante en el crecimiento bacteriano, pues, deben proporcionarles fuentes de energía, carbono, nitrógeno, sales y agua. Pero en algunos casos no es suficiente este requerimiento básico, por lo que es necesario añadir sustancias especiales. Los medios de cultivo tienen dos propósitos principales que son: crear el ambiente propicio para el crecimiento bacteriano y proveer algunas reacciones bioquímicas características de cada especie, que luego serán empleadas para la identificación microbiana. (Fernández, et al, 2010).

Medios de cultivo básicos

Estos medios permiten el crecimiento de la mayoría de bacterias; por lo general están compuestos de extracto de carne, sustancia encargada de proporcionar vitaminas, aminoácidos y en pequeñas cantidades hidrogeno, nitrógeno y carbono. Otros componentes de estos medios de cultivo son la sal y el agua; el cloruro de sodio crea un ambiente de isotonicidad para mantener la presión osmótica constante. (Bailón, et al, 2003).

Ejemplos:

- Agar cerebro corazón
- Agar dextrosa saboraud

Medios de cultivo enriquecidos

Además de estar compuesto de las sustancias básicas para el crecimiento de la mayoría de bacterias; contiene vitaminas, proteínas, aminoácidos y líquidos corporales. (Bailón, et al, 2003).

Ejemplos:

- Agar sangre
- Agar Mueller- Hinton

Medios de cultivo selectivos

Al medio de cultivo base, se le agregan sustancias que inhiben el crecimiento de algunas bacterias y que fomentan el crecimiento de otras; estas sustancias pueden ser: antibióticos, antisépticos, sales biliares y cloruro de sodio pero a concentraciones muy altas. (Fernández, et al, 2010).

Ejemplo:

- Agar manitol salado.- este medio se usa para aislar *Staphilococcus*, pues su alto contenido de sal inhibe el crecimiento de las demás bacterias.

Medios de cultivo diferenciales

Estos medios son para poner de manifiesto la diferencia entre los grupos de bacterias. (Fernández, et al, 2010).

Ejemplo:

- Agar Mc Conkey.- este medio inhibe el crecimiento de bacterias gram positivas, pues contiene sales biliares que no favorecen el crecimiento de las mismas.

1.1.2.3 Medios de cultivo especiales o pruebas Bioquímicos

Estos medios debido a sus compuestos sirven para identificar ciertas características bioquímicas de las bacterias, de ahí su nombre. De estas pruebas existen muchas, unas de lectura rápida y otras de lectura lenta; las de lectura rápida se fundamentan en la existencia de una enzima que al contacto con una sustancia reaccionan a los pocos segundos o minutos. Las pruebas bioquímicas de lectura

lenta requieren de horas de incubación, aquí se determinan ciertos componentes metabólicos que reaccionan con una sustancia dada. (Fernández, et al, 2010).

Pruebas bioquímicas de lectura rápida

Catalasa. Es una enzima que forma parte de casi todas las bacterias que tienen citocromos (proteínas que interviene en el transporte de energía). Esta enzima al entrar en contacto con el peróxido de hidrogeno lo hidroliza en agua y oxígeno, este último es rápidamente observable pues se presenta en forma de burbujas. (Fernández, et al, 2010).

Oxidasa. En una enzima que cataliza las reacciones oxido reducción, el oxígeno se reduce dando como resultado agua o peróxido de hidrogeno; esta reacción con anteriormente descrita van ligadas, pues la catalasa degrada el peróxido de hidrogeno que se formó por la reducción del oxígeno. Esta reacción la efectúan las bacterias aerobias y las anaerobias facultativas. (Fernández, et al, 2010).

Pruebas bioquímicas de lectura lenta

Prueba de oxidación y fermentación. Medio de Hugh-Leifson O/F

Composición:

- Peptona
- Cloruro de sodio
- Fosfato dipotásico.
- Agar
- Glucosa
- Azul de bromotimol

Fundamento:

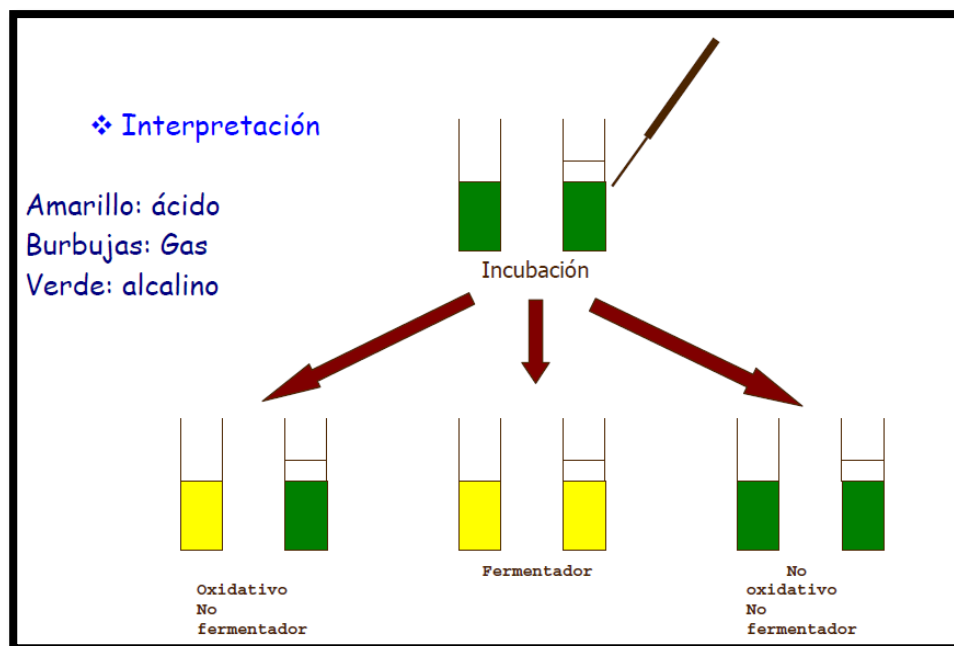
Con esta prueba se determina si las bacterias metabolizan un hidrato de carbono por oxidación o fermentación. La diferencia entre estos metabolismos es la disponibilidad de oxigeno que se les proporciona a las bacterias en este medio; la fermentación es el proceso metabólico que libera energía a partir de un azúcar todo esto bajo condiciones anaeróbicas, debido a que este metabolismo produce una elevada acidez se añade fosfato de potasio que actúa como buffer manteniendo en equilibrio el pH. En la oxidación la condición es diferente, aquí se requiere de la

presencia de oxígeno y la poca acidez que libera este metabolismo se ve neutralizada con la elevada concentración de carbohidratos y la baja concentración de peptona. (Bailón, et al, 2003).

Para la ejecución de esta prueba se requiere de dos tubos, el uno que crece expuesto al aire mientras que el otro es sellado con parafina para crear el ambiente anaerobio; las bacterias aerobias estrictas son oxidativas y las aerobias tolerante con las anaerobias estrictas son fermentativas. (Pumarola, 1987).

Interpretación:

Figura 5-1 Interpretación de la prueba de Oxidación/Fermentación



Fuente: Lucía Bailón

Cuadro 2-1 Interpretación de los resultados de la Prueba de oxidación y fermentación

Color tubo sin parafina	Color tubo con parafina	Resultado
Amarillo	Verde	Oxidación (O+) no fermentación (F-)
Amarillo	Amarillo	Fermentación (F+)
Verde	Verde	Oxidación (O+) Fermentación (F-)

Fuente: Lucía Bailón

Prueba de glucosa y lactosa. Medio Kligler

Composición:

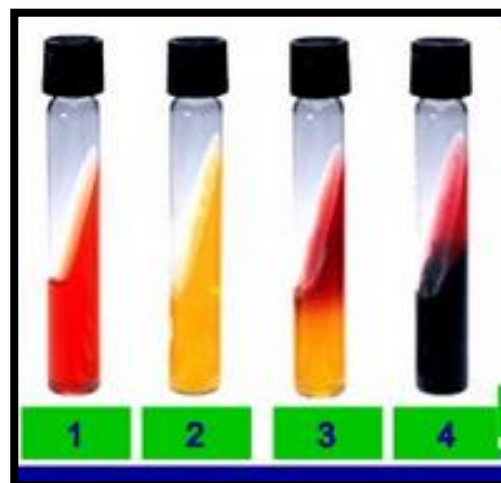
- Peptona
- Cloruro de sodio
- Lactosa
- Tripteina
- Glucosa
- Citrato de hierro y amonio
- Tiosulfato de sodio
- Agar
- Indicador de pH: Rojo de fenol

Fundamento:

Cada componente de este y los demás medios cumplen funciones específicas; la peptona y tripteina son las sustancias que brindan los nutrientes necesarios para el crecimiento del microorganismo, el cloruro de sodio mantiene el equilibrio osmótico, el agar es el agente solidificante, el rojo de fenol es el indicador de pH, estos son los componentes comunes de la mayoría de medios, sin embargo existen otras sustancias que cumplen funciones para diferenciar las distintas reacciones. En esta prueba se determina si la bacteria es fermentadora de lactosa y/o glucosa, si el microorganismo fermenta uno de estos carbohidratos, se producen ácidos, los mismos que son revelados por el rojo de fenol provocando el cambio de color del medio. Para que se dé el precipitado negro del sulfuro de hierro, el tiosulfato de sodio se reduce a sulfuro de hierro, el mismo que reacciona con la sal de hierro. (Bailón, et al, 2003)

Interpretación:

Figura 6-1 Interpretación de la prueba Kligler



1.- medio 2.- fermenta lactosa y glucosa 3.- fermenta glucosa 4.- producción de H₂S

Fuente: Lucía Bailón

K / A (Fermentación de glucosa solamente)

A / A (Fermentación de glucosa y lactosa)

K / K (No fermentación de glucosa y lactosa).

Cuadro 3-1 Interpretación de los resultados de la prueba de la glucosa y lactosa

Kligler					
Fermenta lactosa		Fermenta glucosa		Producción de H ₂ S	
Color	Resultado	Color	Resultado	Color	Resultado
Amarillo en la parte superior	+	Amarillo en la parte inferior	+	Ennegrecimiento del medio	+

Fuente: Lucía Bailón

Prueba del Citrato. Medio citrato de Simmons

Composición:

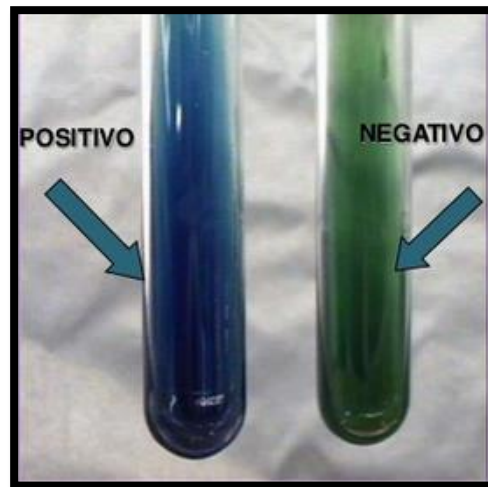
- Sulfato de magnesio
- Monofosfato de amonio
- Fosfato dipotásico
- Citrato de sodio
- Cloruro de sodio
- Agar
- Agua destilada

Fundamento:

Esta prueba sirve para identificar si las bacterias usan el citrato como única fuente de carbono y el fosfato de amonio como fuente de nitrógeno. El metabolismo del citrato requiere de la condensación del acetilo con la coenzima A y el oxalacetato para que ingresen al ciclo de Krebs; pero en las bacterias no se requiere de la coenzima A si no una enzima denominada citratasa que en la reacción da como intermediarios al oxalacetato y el acetato. (MacFaddin, 2003)

Interpretación:

Figura 7-1 Interpretación de los resultados de la prueba del citrato



Fuente: Lucía Bailón

Cuadro 4-1 Interpretación de los resultados de la prueba del citrato

Color	Resultado
Verde	-
Azul	+

Fuente: Lucía Bailón

Prueba de Sulfuro Indol y Movilidad. Medio SIM

Composición:

- Extracto de carne

- Peptona
- Hierro peptonizado (indicador de SH₂)
- Tiosulfato de sodio (indicador de SH₂)
- Agar
- Agua destilada

Fundamento:

Ácido sulfhídrico.- Algunas bacterias con ayuda de la enzima cisteinasa liberan azufre de los diferentes aminoácidos (aa), los mismos que son resultado de la proteólisis de las proteínas. Para que se de esta reacción las bacterias reaccionan con el tiosulfato de sodio produciendo ácido sulfhídrico SH₂ el mismo que reacciona con el citrato férrico de amonio lo que produce un precipitado insoluble de color negro. (Bailón, et al, 2003).

Indol.- El indol es la sustancia que se libera de la degradación del aa triptófano, esta reacción es catalizada por la enzima triptofanasa. La prueba del indol determina si la bacteria tiene la enzima que degrada el triptófano; y se basa en la formación de un complejo rojo, este complejo se forma cuando el indol reacciona con el grupo aldehído del compuesto p-dimetilaminobenzaldehído o reactivo de Kovacs.

Movilidad.- En este y otros medios se puede observar la movilidad de las bacterias como una nube que se forma fuera del lugar del inculo, esto indica que la bacteria tiene flagelos que son los responsables de brindar movilidad a los microorganismo; estos flagelos pueden ser muchos o pocos según sea la especie bacteriana

Interpretación

Cuadro 5-1 Interpretación de los resultados de la prueba del Sulfuro Indol y Movilidad

SIM					
Indol		H ₂ S		Movilidad	
Color	Resultado	Color	Resultado	Color	Resultado
Anillo rojo	+	Ennegrecimiento del medio	+	Nube alrededor de la línea de siembra	+

Fuente: Lucía Bailón

Prueba de la ureasa. Medio urea de Christensen.

Composición:

- Peptona
- Cloruro de sodio
- Fosfato monopotásico
- Glucosa
- Urea
- Agar
- Agua destilada
- Indicador de pH: Rojo de fenol

Fundamento:

Prueba que establece la capacidad de una bacteria para utilizar el nitrógeno proveniente de la urea, la reacción se da con intervención de la enzima ureasa, esta hidroliza la urea en amoníaco y dióxido de carbono. Con estos productos el medio de cultivo se alcaliniza haciendo que el indicador de pH vire de color el medio, de amarillo a rosa.

Interpretación.

Figura 8-1 Interpretación de la prueba de la ureasa



Fuente: Lucía Bailón

Cuadro 6-1 Interpretación de los resultados de la prueba de la ureasa.

Color	Resultado
Rosado	+
Amarillo	-

Fuente: Lucía Bailón

Prueba- hidrolisis de almidón. Agar almidón

Componentes:

- Peptona
- Almidón soluble
- Agar
- Agua destilada

Fundamento:

Debido a que el almidón es una molécula muy compleja para su asimilación, es necesario que esta sea desdoblada o hidrolizada; la enzima amilasa es la encargada de convertir el almidón en amilasa sustancia asimilable por las bacterias, y es precisamente esta enzima la que se determina en esta prueba. Si la bacteria es capaz de degradar el almidón, en el medio de cultivo se forma un halo alrededor de la colonia, pero para comprobar si se hidrolizo o no el almidón se añade solución de lugol, esta solución al entrar en contacto con el almidón lo tiñe de color azul indicando que la reacción es negativa, es decir la bacteria no hidroliza el almidón; caso contrario si la reacción es positiva al añadir el lugol se formara una zona clara. (Racchumi)

Interpretación:

Figura 9-1 Interpretación de la prueba de la prueba hidrolisis de almidón



Fuente: Marco Racchumi

Cuadro 7-1 Interpretación de los resultados de la prueba del almidón

Color	Resultado
Halo alrededor de la colonia	+
Crecimiento sin halo	-

Fuente: Lucía Bailón

Prueba- hidrólisis de gelatina. Agar gelatina

Componentes:

- Peptona
- Gelatina
- Agar
- Agua destilada

Fundamento:

Algunas bacterias tienen enzimas del tipo proteolíticas, las gelatinasas que tienen la función de desdoblar las proteínas en sustancias más sencillas para que puedan ser asimiladas; para determinar si esta es prueba es positiva o negativa se observa si alrededor de la colonia se forma una zona blanca. (Bailón, et al, 2003)

Interpretación:

Cuadro 8-1 Interpretación de los resultados de la prueba de la gelatina

Color	Resultado
Halo alrededor de la colonia	+
Crecimiento sin halo	-

Fuente: Lucía Bailón

En función a los resultados de las pruebas bioquímicas anteriormente descritas, Álvarez, Boquet y de Fez en su Manual de Técnicas en Microbiología Clínica agrupan las características de ciertas bacterias para poder diferenciarlas.

Cuadro 9-1 Características para la diferenciación de especies de la familia Enterobacteriaceae

CARACTERISTICAS PARA LA DIFERENCIACION DE ESPECIES DE LA FAMILIA ENTEROBACTERIACEAE*											
	KLIGER										
	Glucosa	Gas/Glucosa	Lactosa	SH ₂	Citrato	Fenilalanina desaminasa	Indol	Lisina decarboxilasa	Manitol	Movilidad	Ureasa
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	-	-	-	+	+	+	V ⁺	-
<i>Escherichia coli inactivo</i>	+	-	V ⁻	-	-	-	+	V	-	-	-
<i>Shigella dysenteriae</i>	+	-	-	-	-	-	V	-	+	-	-
<i>Shigella flexneri</i>	+	-	-	-	-	-	V	-	+	-	-
<i>Shigella boydii</i>	+	-	-	-	-	-	V ⁻	-	+	-	-
<i>Shigella sonnei</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Edwardsiella tarda</i>	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+
<i>Klebsiella ozaenae</i>	+	V	V ⁻	-	V ⁻	-	-	V	+	-	V ⁻
<i>Klebsiella rhinoscleromatis</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
<i>Enterobacter cloacae</i>	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	V ⁺
<i>Enterobacter aereogenes</i>	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-
<i>Enterobacter agglomerans</i>	+	V ⁻	V	-	V	V ⁻	V ⁻	-	+	V ⁺	V ⁻
<i>Enterobacter gergoviae</i>	+	+	V	-	+	-	-	+	+	+	+
<i>Enterobacter sakazakii</i>	+	+	+	-	+	V	V ⁻	-	+	+	-
<i>Serratia marcescens</i>	+	V	-	-	+	-	-	+	+	+	V ⁻
<i>Serratia liquifaciens</i>	+	V	V ⁻	-	+	-	-	V ⁺	+	+	-
<i>Serratia rubidaea</i>	+	V	+	-	+	-	-	V	+	V ⁺	-
<i>Morganella morganii</i>	+	V ⁺	-	-	-	+	+	-	-	+	+
<i>Proteus mirabilis</i>	+	V ⁺	-	+	V ⁺	+	-	-	-	+	+
<i>Proteus vulgaris</i>	+	V ⁺	-	+	V ⁻	+	+	-	-	+	+
<i>Providencia alcalifaciens</i>	+	V ⁺	-	-	+	+	+	-	-	+	-
<i>Providencia rettgeri</i>	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+
<i>Providencia stuartii</i>	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	V ⁻

Fuente: Álvarez, Boquet y de Fez

1.2 Aguas termales y sus aplicaciones terapéuticas

1.2.1 Definiciones

1.2.1.1. *“Agua natural. Es aquella proveniente de fuentes naturales, tales como ríos, lagos, manantiales y otros.”* (NTE INEN 1882:2013)

1.2.1.2 *“Agua mineral natural. Es el agua obtenida directamente de fuentes naturales, que se caracteriza por el contenido en sales minerales, presencia de oligoelementos, recogidas en condiciones que garanticen su pureza bacteriológica original, envasadas en la fuente en condiciones higiénicas-sanitarias.”* (NTE INEN 1882:2013)

1.2.1.3 *“Agua salina. El agua que contiene altas concentraciones de sal, cloruro de sodio, sobre todo más que el agua dulce, pero menos común que el agua del mar.”* (NTE INEN 1882:2013)

1.2.2 Hidroterapia

Píndaro un poeta de Grecia decía: “el agua es lo mejor que existe”, frase muy acertada, pues el agua tiene múltiples aplicaciones, una de las más conocidas desde hace mucho tiempo atrás es la hidroterapia; tratamiento que consiste en aplicar agua en cualquier estado físico o temperatura con fines terapéuticos. Los efectos terapéuticos del agua se deben a los principios mecánicos y térmicos. (Molto, 1992)

1.2.3 Principios mecánicos del agua

Son los efectos que recibe el cuerpo humano una vez que se sumerge en el agua; este principio depende de tres factores que son: hidrostático, hidrodinámico e hidrocínético. El factor o presión hidrostática, es la más importante en hidroterapia, tiene como base los estudios de flotación por Arquímedes y los de compresión por Pascal; estos estudios describen que cuando el organismo humano se sumerge en el agua, esta ejerce una cierta presión que aumenta con la altura del nivel del líquido sobre las estructuras orgánicas y con su peso específico.

Este factor hace que tengamos un peso menor al normal una vez que nos introducimos en el agua, el ser livianos nos facilitara movernos y relajar las articulaciones, por lo que esta terapia es recomendada para las personas que sufren de limitaciones en sus movimientos; otros beneficio es en el sistema respiratorio, nervioso y circulatorio. (Molto, 1992)

1.2.4 Principios térmicos del agua

Cuando se tratan de aguas con temperaturas de 38 a 42°C se abren los capilares por lo que se facilita la circulación sanguínea al corazón, además estas aguas alivian la rigidez muscular, tienen efectos analgésicos pero se debe tener cuidado cuando las temperaturas son más elevadas que las antes mencionadas, pues el estar mucho tiempo sumergidos en ellas puede provocar sedación y pérdida de electrolitos, esta última situación debido a que mientras más se eleva la temperatura el organismo empieza a sudar provocando la pérdida de agua y junto con ella, electrolitos. (Molto, 1992)

1.2.5 Aguas termales

Son aquellas que atraviesan las capas subterráneas de la tierra y emanan a la superficie con una temperatura mayor a 5°C de la temperatura ambiente en donde se encuentran ubicadas. Todas las aguas termales son minero-medicinales (aguas que en su composición tiene minerales con capacidades terapéuticas), pero no todas las aguas minero medicinales son termales. Las altas temperaturas de las termas se deben a que el agua que se encuentra en el interior de la tierra circula por las fisuras de las rocas y por un efecto termodinámico la temperatura se eleva grandemente. En las regiones donde existen volcanes el agua puede ser caliente debido a que el magma calienta las rocas por donde circula el agua; pero la influencia de los volcanes también puede afectar el agua. (Molto, 1992)

1.2.5.1 Clasificación de las aguas termales

Según su temperatura

- Frías: menos de 20°C
- Hipotermas: de 20°C a 30°C
- Termas: de 30°C a 40°C
- Hipertermas: más de 40°C. (INAMHI, 2013)

Origen geológico

- **Magmática:** aguas originadas luego de una erupción volcánica
- **Juvenil:** agua que no está en contacto con la atmósfera
- **Telúricas:** Agua provenientes de las infiltraciones de la lluvia

1.2.5.2 Ph y efectos según la composición química de las aguas termales.

En caso de que las aguas sean demasiado calientes, estas llegan a un punto de ebullición mucho antes de salir a la superficie por lo que la tierra solo emana vapor, el mismo que al unirse con agua fría se oxida y le da un carácter ácido al manantial. (Molto, 1992)

- **Aguas bicarbonatadas:** Estas aguas al ser ingeridas en ayunas alcalinizan el pH gástrico, lo que favorece a la digestión.
- **Aguas cloradas:** Agua con efectos antiinflamatorios y que al entrar en contacto con la piel aumentan sus defensas.
- **Aguas ferruginosas:** Son aguas con un alto contenido de hierro, gracias a este compuesto son útiles para personas que padecen algún tipo de anemia, especialmente anemia ferropénica, también resultan muy útiles para niños con deficiencia de hierro en el organismo.
- **Aguas Sulfurosas:** Aguas altamente calientes que están indicadas para complicaciones con las articulaciones y para procesos post-operatorios, así como es útil en estos casos, no se recomienda para personas que tengan problemas de presión elevada.
- **Aguas sulfuradas:** Aguas cuya composición mayoritaria es el azufre por lo que el olor de estas aguas es característico de huevos podridos; son recomendadas para reumatismo, prurito y eczemas de la piel, problemas respiratorios crónicos como: laringitis, rinitis y asma.
- **Aguas radioactivas:** La composición mayoritaria de estas aguas es el gas radón, el inhalar estas aguas reduce los niveles de estrés, este gas tiene propiedades analgésicas y sedantes. (Molto, 1992)

1.2.5.3 Usos terapéuticos de las aguas termales

- **Aparato digestivo:** Acelera el peristaltismo por lo que facilita la eliminación de los desechos.
- **Aparato urinario:** aumenta la eliminación de orina
- **Sistema nervioso:** Cuando se trata de estímulos calientes de corta duración aumenta ligeramente la sensibilización y en caso contrario, es decir, estímulos de larga duración se produce un efecto analgésico y sedante.
- **Músculos:** Relaja el tono muscular debido a que disminuye la actividad gamma de las terminaciones propioceptivas de los músculos que son las responsables del tono muscular.
- **Órganos:** Mejora su irrigación y por ende el funcionamiento de los órganos (San José, 1998)

1.2.5.4 Microbiota de las aguas termales.

El agua constituye la principal fuente de vida para el hombre, pero muchas veces actúa como vehículo de transmisión de microorganismos. Las aguas termales no están exentas de microorganismos, la diversidad de estos depende de las características propias del agua, es decir: temperatura, pH y composición química (autóctono); además pueden existir microorganismos procedentes de distintas hábitats (alóctonos), que se adaptan a las condiciones extremas de las aguas termales y resultan contaminantes y perjudiciales para la salud. (De la Rosa y Mosso).

Microorganismos Autóctonos.- Estas bacterias crecen mejor en medios pobres en carbono, por las altas temperaturas del agua existen bacterias termófilas, pero la mayor parte de microorganismos que habitan estas aguas son bacterias mesófilas que se han adaptado a las condiciones del agua. En menor número se han identificado bacterias autótrofas. En aguas sulfuradas se encuentran bacterias que oxidan el azufre por ejemplo *Thiobacillus*, en aguas ferruginosas encontramos bacterias que oxidan el hierro ferroso a férrico, las bacterias que realizan este trabajo son *Clonothrix*, *Leucothrix*, entre otras; bacterias halófilas como *Micrococcus* y *Vibrio* están presentes en aguas cloruradas sódicas e hipertónicas. (De la Rosa y Mosso).

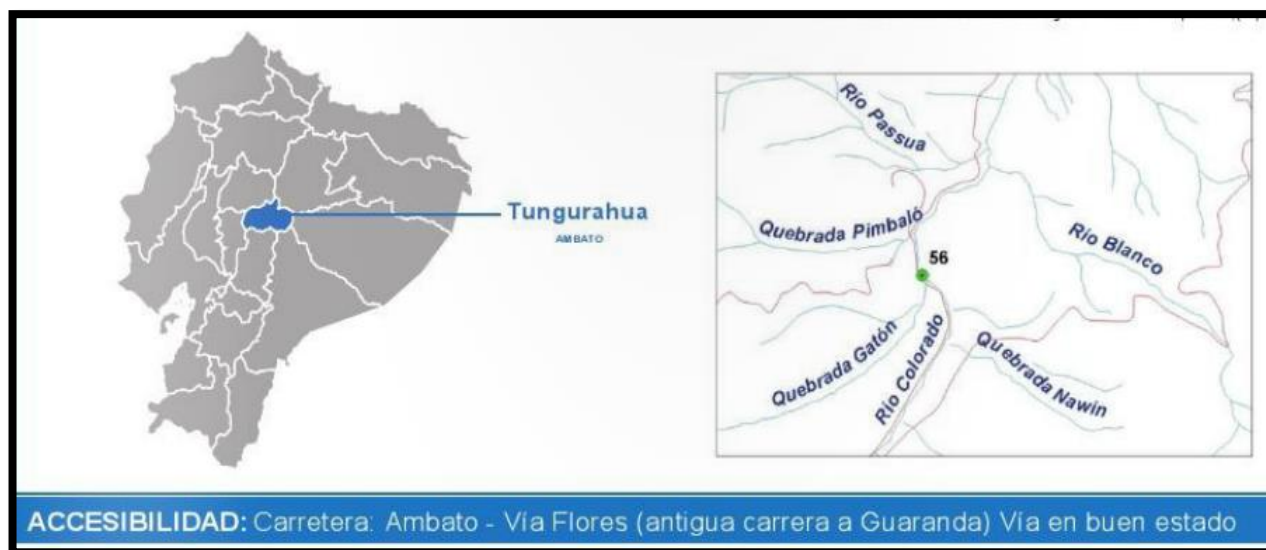
Microorganismos Alóctonos.- Son bacterias que a través de cualquier medio ingresan al agua y la contaminan; estudios indican que se han detectado *enterococos*, *coliformes* y *Pseudomonas aeruginosa*; es por ello que se deben analizar la existencia de bacterias indicadoras de contaminación: Coliformes fecales (indican contaminación fecal), *Pseudomonas* (indican deterioro en la calidad del agua o a su vez una recontaminación) y *Aerobias mesófilas* (indican la efectividad del tratamiento que se le ha dado al agua). Estas bacterias deben ser fáciles de aislar y crecer en el laboratorio, ser relativamente no dañinas para la salud del hombre. (Apella y Araujo)

1.2.5.5 Aguas termales “Reina del Rosario de Cununyacu”

Ecuador es un país que goza de varias fuentes de aguas termales, esto se debe a que estamos ubicados en el cinturón de fuego. Como ya lo mencionamos anteriormente el saber de los beneficios de las aguas termales no es nuevo para la gran mayoría de la población, tal es el caso que en nuestro país se cuenta con spas que no solo realizan terapias con las aguas termales si no que brindan más atenciones como: masajes y terapias con el fango todo esto bajo las condiciones adecuadas. No todas las fuentes han recibido las atenciones necesarias para ser convertidas en balnearios públicos, pero eso no ha sido impedimento para que las personas hagan uso de estas aguas.

Una de las muchas termas en nuestro país son las aguas termales “Reina del Rosario de Cununyacu”, están ubicadas en la provincia de Tungurahua, parroquia Pilahuin, sector Luz María a 20 Km de la provincia Bolívar, por la temperatura del agua que sobrepasa los 42°C están categorizadas como hipertermales.

Figura 1-10 Ubicación de las aguas termales Reina del Rosario de Cununyacu



Fuente: INAMHI. Aguas Termominerales en el Ecuador, 2013

A este lugar no solo acuden personas con el fin realizar terapias y rehabilitaciones, si no también personas que hacen uso de estas aguas para aseo personal, como: niños y adultos mayores, los mismos que son susceptibles a contraer cualquier tipo de infección en caso de que estas aguas tengan agentes patógenos que afecten la salud; para evitar esto sería necesaria que estas aguas sean analizadas microbiológicamente para la seguridad de los bañistas.

Figura 1-11 Análisis realizados a las aguas termales Reina del Rosario

BALANCE IONICO					
ANION	mg/l	CATION	mg/l	OTRAS DETERMINACIONES	
CO ₃ H-	40,00	Na+	560,63	Parámetros	
CO ₃ =	0,0	K+	6,29	pH	8,1
SO ₄ =	379,3	Ca ⁺⁺	272,70	CE (µs/cm)	4530
Cl-	1300,31	Mg ⁺⁺	0,5	DUREZA (mg/l)	682
NO ₃ -	0,28	NH ₄ ⁺	1,025	TEMPERAT (°C)	40,30
NO ₂	<0,05	Fe=	<0,5		
PO ₄ =	<0,5				
OTRAS DETERMINACIONES					
Turbidez	0		Cobre	<0,25	
Color	21		Cromo	<1	
Alcalinidad	40		Plomo	<1	
STD	2930,91		SiO ₂	61,76	
CO ₂	0,57		Mn	<0,05	
OBSERVACIONES:					
TIPO DE AGUA					
CLORURADA SODICA					
HIPERTERMAL					

Fuente: INAMHI. Aguas Termominerales en el Ecuador, 2013

Como se observa en la tabla, las aguas termales Reina del Rosario de Cununyacu no ha recibido un análisis microbiológico, aun siendo muy concurridas no solo por personas para aliviar patologías si no por público en general, por lo que es urgente complementar esos análisis con un estudio de calidad sanitaria que es el análisis de la microbiota.

CAPITULO II

2 MARCO METODOLÓGICO

2.1 Población de estudio y localización de muestreo

La población de estudio son las bacterias autóctonas y aloctona, mohos y levaduras presentes en el ojo de agua como en una de las piscinas de las aguas termales Reina del Rosario de Cununyacu.

2.2 Ubicación de las Agua termales Reina del Rosario de Cununyacu

Estas termas se localizan en la Provincia de Tungurahua parroquia Pilahuin, sector Luz María a 20 Km de la Provincia Bolívar.

2.3 Metodología

2.3.1 Muestreo

Se tomaron muestras de agua del ojo de agua, es decir, de donde brota el agua caliente y de una de las piscinas del balneario con las condiciones de asepsia necesarias.

2.3.2 Siembra en Petrifilm para recuento de *E. coli*/Coliformes

2.3.2.1 Materiales

- a. Placas petrifilm para *E. coli*/Coliformes
- b. Muestra de agua
- c. Pipeta de 1mL
- d. Cámara de flujo laminar

- e. Estufa

2.3.2.2 Procedimiento

- a. Una vez desinfectada la cámara de flujo laminar colocar tanto la placa petrifilm como la muestra de agua dentro de ella.
- b. Levantar el film superior, tomar 1mL de muestra y con la pipeta de forma perpendicular a la placa petrifilm dejar caer lentamente la muestra en el centro del film inferior.
- c. Bajar el film superior despacio para evitar que se formen burbujas de aire.
- d. Ubicar el difusor con el lado liso sobre el petrifilm y ejercer suavemente presión para que el inóculo se distribuya por toda la superficie circular antes que se solidifique el gel.
- e. Llevar las placas a la estufa e incubar a 35°C durante 24 horas para coliformes y durante 48 horas para *E. coli*.

2.3.2.4 Interpretación

- a. Para mayor facilidad realizar el conteo de las colonias con una lupa y bajo una buena iluminación.
- b. Las colonias azules con burbujas de gas a su alrededor son *Escherichia coli*.
- c. Las colonias que no sean azules pertenecen al grupo de las coliformes totales.
- d. El rango de conteo en las placas petrifilm EC es de 15 – 150
- e. Si se da el caso de que las colonias son incontables se toma una o más cuadros representativos, se cuentan las colonias, se saca un promedio y se multiplica por 20 (aproximadamente 20 cm² es el área circular donde crecen las bacterias).

2.3.3 Siembra en Petrifilm Sistema de Recuento Staph Express

2.3.3.1 Materiales

- a. Placas petrifilm Staph Express
- b. Muestra de agua
- c. Pipeta de 1mL
- d. Cámara de flujo laminar
- e. Estufa

2.3.3.2 Procedimiento

- a. Una vez desinfectada la cámara de flujo laminar colocar tanto la placa petrifilm como la muestra de agua dentro de ella.
- b. Levantar el film superior, tomar 1mL de muestra y con la pipeta de forma perpendicular a la placa petrifilm dejar caer lentamente la muestra en el centro del film inferior.
- c. Bajar el film superior despacio para evitar que se formen burbujas de aire.
- d. Ubicar el difusor con el lado liso sobre el petrifilm y ejercer suavemente presión para que el inculo se distribuya por toda la superficie circular antes que se solidifique el gel.
- e. Llevar las placas a la estufa e incubar a 37°C durante 24 horas

2.3.3.3 Interpretación

- a. Si al cabo de las 24 horas no hay crecimiento el análisis se da por terminado y la respuesta es 0 UFC/mL.
- b. Si a las 24 horas aparecen colonias de color rojo-violeta se deben contabilizar como *S. aureus* puesto que este medio es selectivo para este tipo de microorganismos.
- c. En caso de que crezcan colonias de color azul – verde estas no se tratan de *S. aureus*, pueden ser solo el género *Staphylococcus* mas no la especie; pero al no estar seguros con el color de las colonias colocar el disco Petrifilm Staph Express de la siguiente manera: levantar el film superior y colocar el disco tomándolo de la lengüeta, luego bajar el film y aplicar presión con los dedos para asegurar que las colonias entren en contacto con el disco.
- d. Incubar a la misma temperatura durante tres horas
- e. Contar las zonas rosas como *S. aureus*

2.3.4 Siembra en Petrifilm para Recuento de Aerobios

2.3.4.1 Materiales

- a. Placas petrifilm para Recuento de Aerobios
- b. Muestra de agua
- c. Pipeta de 1mL
- d. Cámara de flujo laminar
- e. Estufa

2.3.42. *Procedimiento*

- a. Una vez desinfectada la cámara de flujo laminar colocar tanto la placa petrifilm como la muestra de agua dentro de ella.
- b. Levantar el film superior, tomar 1mL de muestra y con la pipeta de forma perpendicular a la placa petrifilm dejar caer lentamente la muestra en el centro del film inferior.
- c. Bajar el film superior despacio para evitar que se formen burbujas de aire.
- d. Ubicar el difusor con el lado liso sobre el petrifilm y ejercer suavemente presión para que el inóculo se distribuya por toda la superficie circular antes que se solidifique el gel.
- e. Llevar las placas a la estufa e incubar a 30°C durante 48 horas

2.3.4.3 *Interpretación*

- a. Contar las colonias de color rojo como aerobios

2.3.5 ***Siembra en Petrifilm para Recuento de Mohos y Levaduras***

2.3.5.1 *Materiales*

- a. Placas petrifilm para Recuento de Mohos y Levaduras
- b. Muestra de agua
- c. Pipeta de 1mL
- d. Cámara de flujo laminar

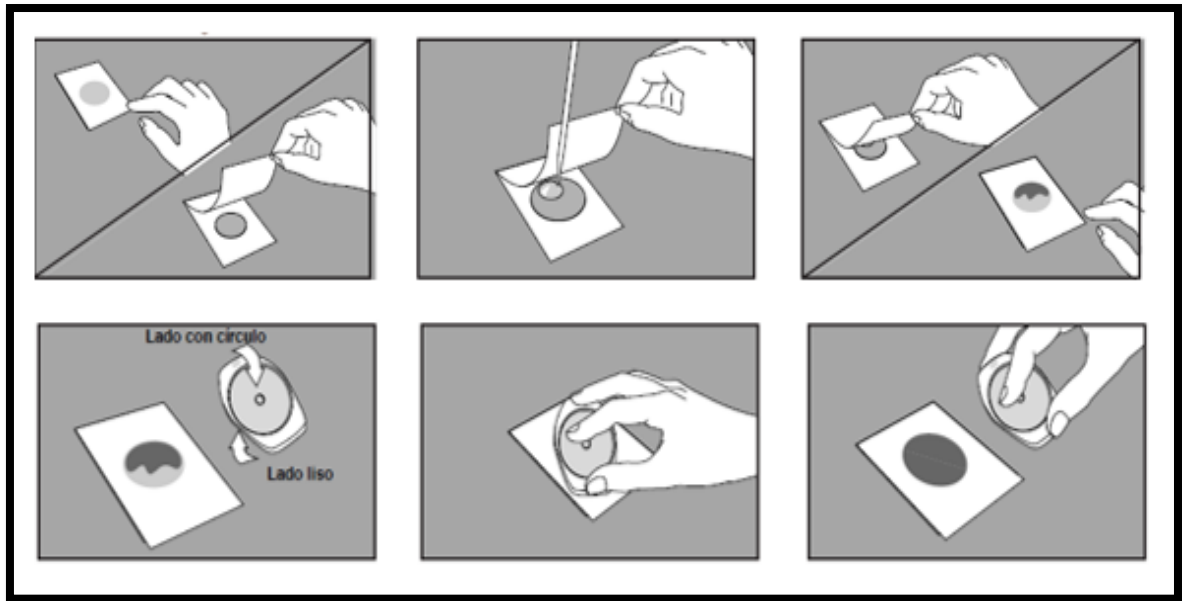
2.3.5.2 *Procedimiento*

- a. Una vez desinfectada la cámara de flujo laminar colocar tanto la placa petrifilm como la muestra de agua dentro de ella.
- b. Levantar el film superior, tomar 1mL de muestra y con la pipeta de forma perpendicular a la placa petrifilm dejar caer lentamente la muestra en el centro del film inferior.
- c. Bajar el film superior despacio para evitar que se formen burbujas de aire.
- d. Ubicar el difusor con el lado liso sobre el petrifilm y ejercer suavemente presión para que el inóculo se distribuya por toda la superficie circular antes que se solidifique el gel.
- e. Incubar las placas a 25°C durante 8 días.

2.3.5.3 Interpretación

- a. Las levaduras son colonias pequeñas de color verde azulado, con bordes definidos.
- b. Los mohos se presentan de un color negruzco, con bordes irregulares y más grandes que las levaduras.

Figura 1-12 Pasos para la siembra en placas Petrifilm



Fuente: (3M, Petrifilm, 2014)

2.3.6 Repiques en Mueller Hinton

2.3.6.1 Materiales y reactivos

- a. Agar Mueller Hinton
- b. Cajas petric
- c. Palillos estériles
- d. Cámara de flujo laminar
- e. Estufa

2.3.6.2 Procedimiento

- a. Preparar el medio de cultivo según lo indique el inserto.
- b. Seleccionar las colonias representativas de las distintas placas petrifilm (aproximadamente 5)

- c. Dentro de la cámara de flujo laminar levantar el film superior del petrifilm y con ayuda de un palillo estéril tomar la colonia seleccionada y dar un toque es el agar Mueller Hinton (repicar); repetir este paso con todas las colonias seleccionadas.
- d. Incubar a 37°C durante 24 horas.
- e. A las 24 horas describir las siguientes características de las colonias: color, tamaño, bordes, forma, entre otras.
- f. De estas colonias realizar un segundo repique y las 24 horas observar las características anteriormente descritas e ir analizando la semejanza entre las colonias.
- g. Realizar un tercer repique con la finalidad de comprobar si las características se mantienen.
- h. En el tercer repique hacer una nueva selección de colonias de la siguiente manera: si las características se repiten entre dos o más colonias y durante los tres repiques elegir solo una colonia de las que sean semejantes y hacer un cuarto repique, de esta manera ir seleccionando un nuevo grupo de colonias e ir repicando.
- i. La finalidad de los cuatro repiques es obtener colonias puras; luego del cuarto repique hacer la tinción Gram a todas las colonias.
- j. Si en la tinción Gram se observan un solo tipo de bacterias es decir, bacilos Gram (-), bacilos Gram (+), cocos positivos o negativos se toma como colonias puras con las que se va a trabajar haciendo las respectivas pruebas para saber de qué bacteria se trata.

2.3.7 Tinción Gram

2.3.7.1 Materiales y reactivos

- a. Placas porta objetos
- b. Cristal violeta
- c. Lugol
- d. Alcohol – cetona
- e. Safranina
- f. Aceite de inmersión
- g. Agua
- h. Microscopio

2.3.7.2 Procedimiento

- a. Codificar las placas porta objetos
- b. Colocar una gota de suero fisiológico en cada uno de los porta objetos.

- c. Con un palillo estéril tomar una pequeña cantidad de la colonia, suspenderla sobre el suero fisiológico y mezclar. Hacer este paso en cada uno de los porta objetos con la colonia que corresponda.
- d. Fijar las muestras en un mechero.
- e. Cubrir las placas con cristal violeta por un minuto. Lavar con agua fría.
- f. Añadir lugol por un minuto. Lavar con agua fría.
- g. Añadir la solución de alcohol-cetona por 30 segundos. Lavar con agua fría.
- h. Por ultimo agregar safranina durante un minuto, lavar, dejar escurrir y observar con el lente de 100x. (Rodríguez y col, 1856-2006).

2.3.8. Prueba de la catalasa

2.3.8.1 Materiales

- a. Placas porta objetos
- b. Palillos esteriles
- c. Peróxido de hidrogeno

2.3.8.2 Procedimiento

- a. En un porta objetos previamente codificado colocar una gota de peróxido de hidrogeno.
- b. Con un palillo estéril tomar una pequeña cantidad de colonia y suspenderla sobre el peróxido de hidrogeno.
- c. Observar si hay presencia de burbujas la reacción es positiva, caso contrario la reacción es negativa.

2.3.9 Prueba de la oxidasa

2.3.8.4 Materiales

- a. Palillos esteriles
- b. Tirilla con el reactivo de Kovac

2.3.8.5 Procedimiento

- a. Tomar una pequeña cantidad de colonia con un palillo estéril y colocarla sobre la tira que contiene el reactivo de Kovac.
- b. Esperar 30 segundos, si en este tiempo la tirilla cambia a color morado la respuesta es positiva caso contraria es negativa.

2.3.10 Prueba de la oxidación y fermentación O/F

2.3.10.1 Materiales

- a. Medio de cultivo Hugh-Leifson
- b. Vaselina
- c. Asa de platino
- d. Estufa
- e. Cámara de flujo laminar

2.3.10.2 Procedimiento

- a. Preparar el medio de cultivo según lo indique el inserto.
- b. Tomar dos con tubos con el medio y codificarlos.
- c. Tubo 1. Con el asa tomar una cantidad de colonia aislada y realizar una siembra por el método de picadura, colocar la tapa al tubo tratando de que no quede totalmente cerrada y pueda ingresar oxígeno.
- d. Tubo 2. . Con el asa tomar una cantidad de colonia aislada y realizar una siembra por el método de picadura, añadir vaselina estéril para evitar la entrada de oxígeno.
- e. Realizar estos pasos con todas las colonias aisladas.
- f. Llevar los tubos a la estufa e incubarlos a 30°C durante 72 horas. (Barrow y Feltham, 1993)

Nota: esta prueba se aplica para bacilos Gram (-)

2.3.11. Prueba del almidón

2.3.11.1 Materiales y reactivos

- a. Agar almidón
- b. Lugol
- c. Cajas petric
- d. Palillos estériles
- e. Cámara de flujo laminar
- f. Estufa

2.3.10.2 Procedimiento

- a. Preparar el medio de cultivo según lo indique el inserto.
- b. Tomar una pequeña cantidad de colonia con un palillo estéril y sembrar en el agar almidón.
- c. Incubar a 30°C durante 8 días.
- d. La prueba es positiva si alrededor de la colonia se forma un halo de color claro.
- e. Para comprobar que la prueba es positiva se añade lugol y debe formarse un color amarillento. (Barrow y Feltham, 1993)

Nota: esta prueba se aplica para bacilos Gram (+)

2.3.12. Prueba de la gelatina

2.3.12.1 Materiales

- a. Agar gelatina
- b. Cloruro de mercurio
- c. Cajas petric
- d. Palillos esteriles
- e. Cámara de flujo lamina
- f. Estufa

2.3.12.2 Procedimiento

- a. Preparar el medio de cultivo según lo indique el inserto.
- b. Tomar una pequeña cantidad de colonia con un palillo estéril y sembrar en el agar gelatina.
- c. Incubar a 30°C durante 8 días.
- d. La prueba es positiva si alrededor de la colonia se forma un halo de color claro; pero para comprobar se puede añadir unas gotas de cloruro de mercurio. (Barrow y Feltham, 1993)

Nota: esta prueba se aplica para bacilos Gram (+)

2.3.13. Kligler

2.3.13.1 Materiales y reactivos

- a. Agar hierro de Kligler
- b. Tubos
- c. Asa y aguja de platino
- d. Cámara de flujo laminar
- e. Estufa

2.3.13.2 Procedimiento

- a. Preparar el medio de cultivo según lo indique el inserto.
- b. Con la aguja de platino tomar una pequeña cantidad de la colonia aislada y realizar la siembra por picadura y realizar estrías en el pico de flauta.
- c. Incubar a 37°C por 24 horas.
- d. Observar los resultados.

2.3.14. Citrato

2.3.13.1 Materiales y reactivos

- a. Agar Citrato
- b. Tubos
- c. Asa y aguja de platino
- d. Cámara de flujo laminar
- e. Estufa

2.3.13.2 Procedimiento

- a. Preparar el medio de cultivo según lo indique el inserto.
- b. Con la aguja de platino tomar una pequeña cantidad de la colonia aislada y realizar la siembra por picadura y realizar estrías en el pico de flauta.
- c. Incubar a 37°C por 24 horas.
- d. Observar los resultados.

2.3.15. SIM

2.3.15.1 Materiales y reactivos

- a. Agar SIM
- b. Tubos
- c. Asa y aguja de platino
- d. Cámara de flujo laminar
- e. Estufa

2.3.15.2 Procedimiento

- a. Preparar el medio de cultivo según lo indique el inserto.

- b. Con la aguja de platino tomar una pequeña cantidad de la colonia aislada y realizar la siembra por picadura y realizar estrías en el pico de flauta.
- c. Incubar a 37°C por 24 horas y observar los resultados.

2.3.16. Urea

2.3.16.1 Materiales y reactivos

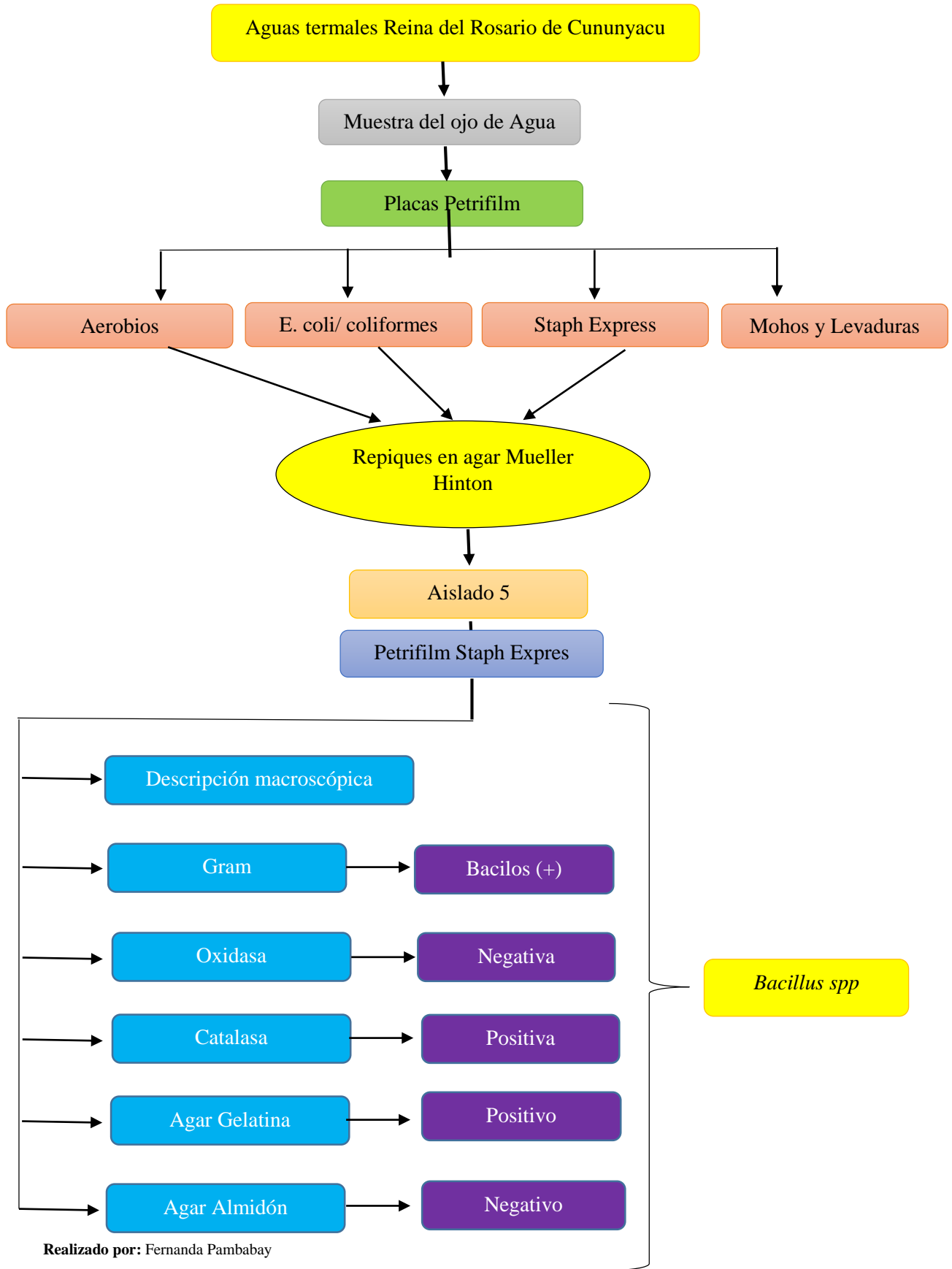
- a. Agar Urea
- b. Tubos
- c. Asa y aguja de platino
- d. Cámara de flujo laminar
- e. Estufa

2.3.16.2 Procedimiento

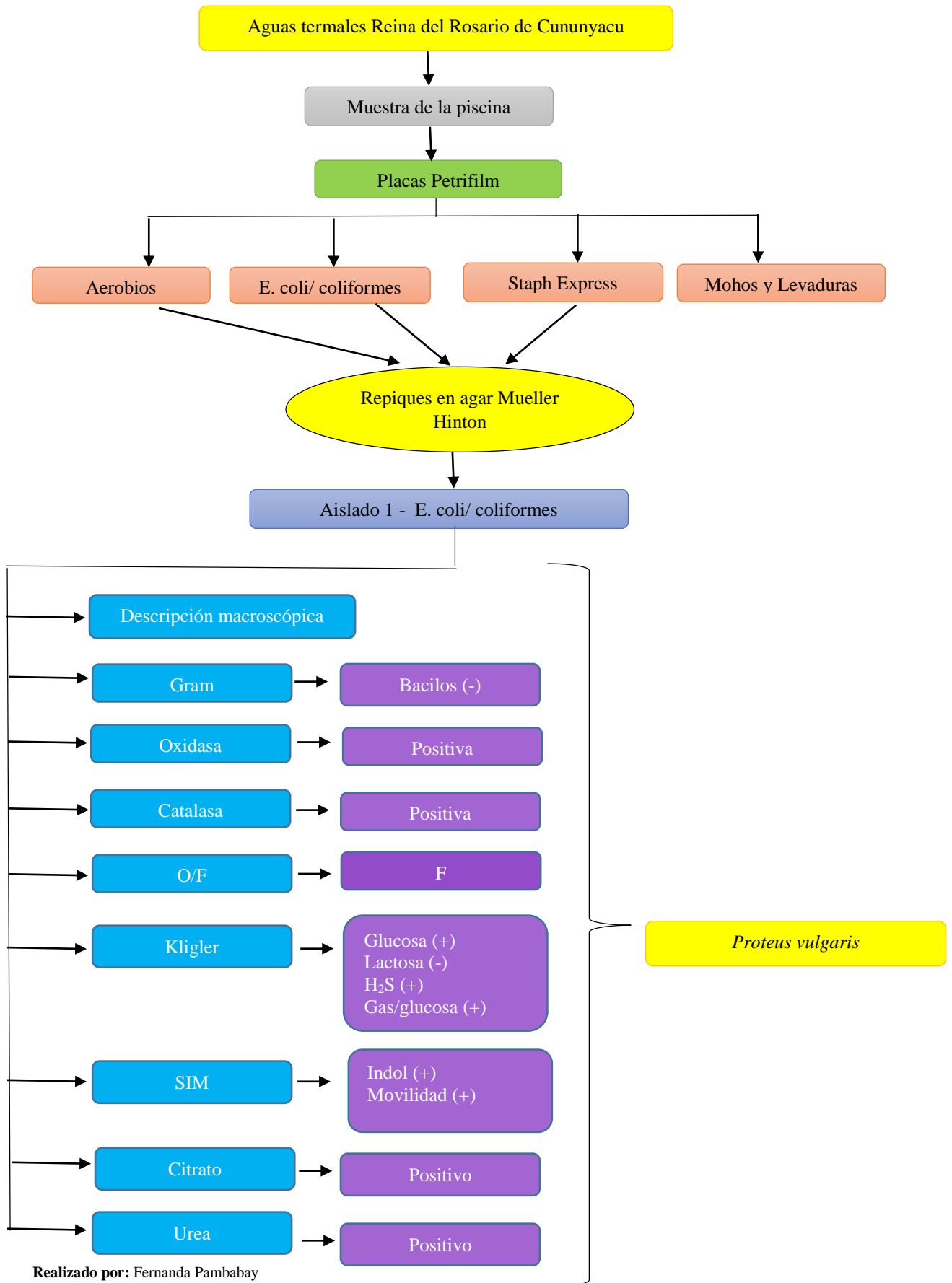
- a. Preparar el medio de cultivo según lo indique el inserto.
- b. Con la aguja de platino tomar una pequeña cantidad de la colonia aislada y realizar la siembra por picadura y realizar estrías en el pico de flauta.
- c. Incubar a 37°C por 24 horas.
- d. Observar los resultados.

2.4 Esquemas de identificación de las bacterias aislada

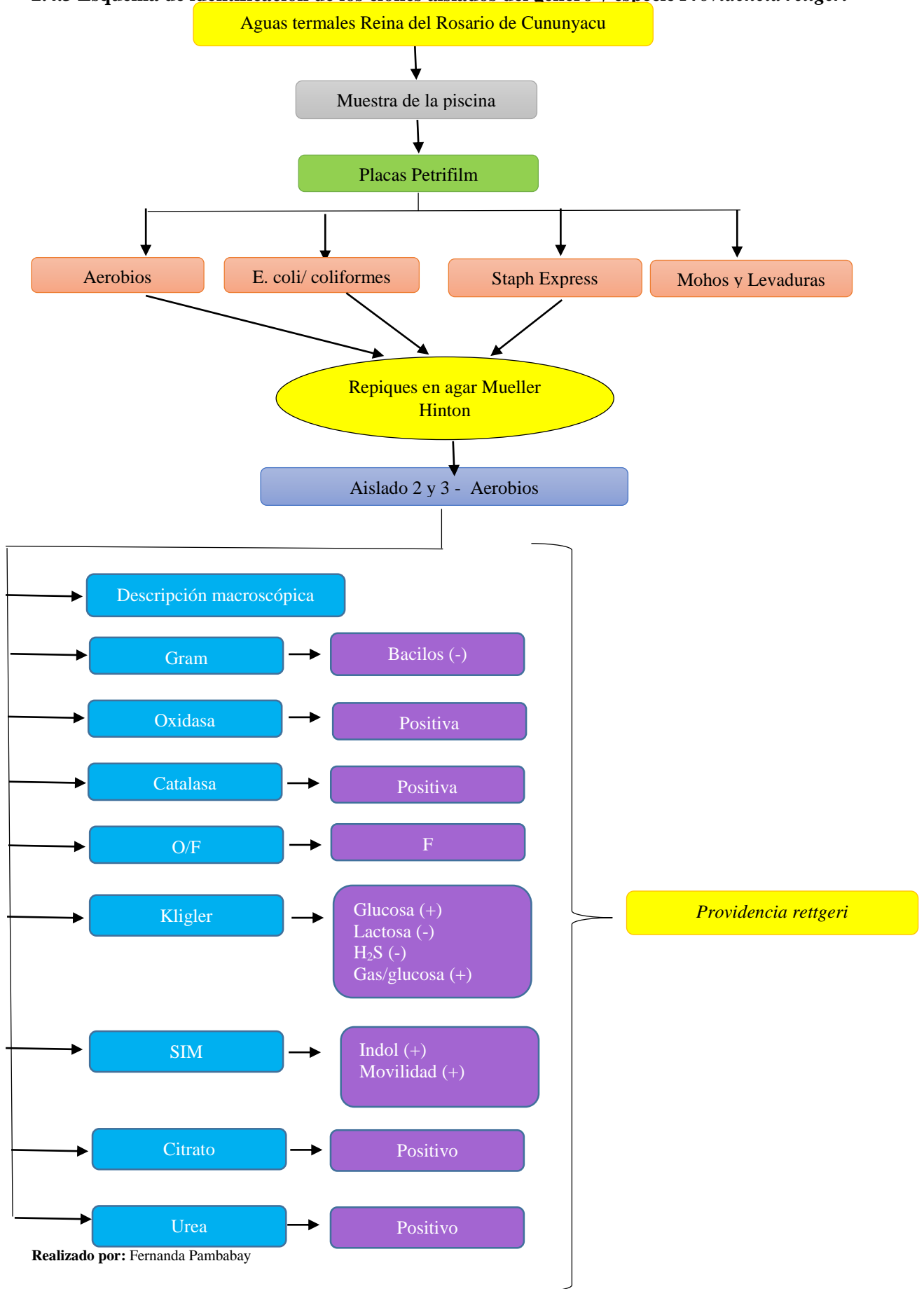
2.4.1 Esquema de identificación del clon aislado del genero *Bacillus*



2.4.2 Esquema de identificación del clon aislado del género y especie *Proteus vulgaris*



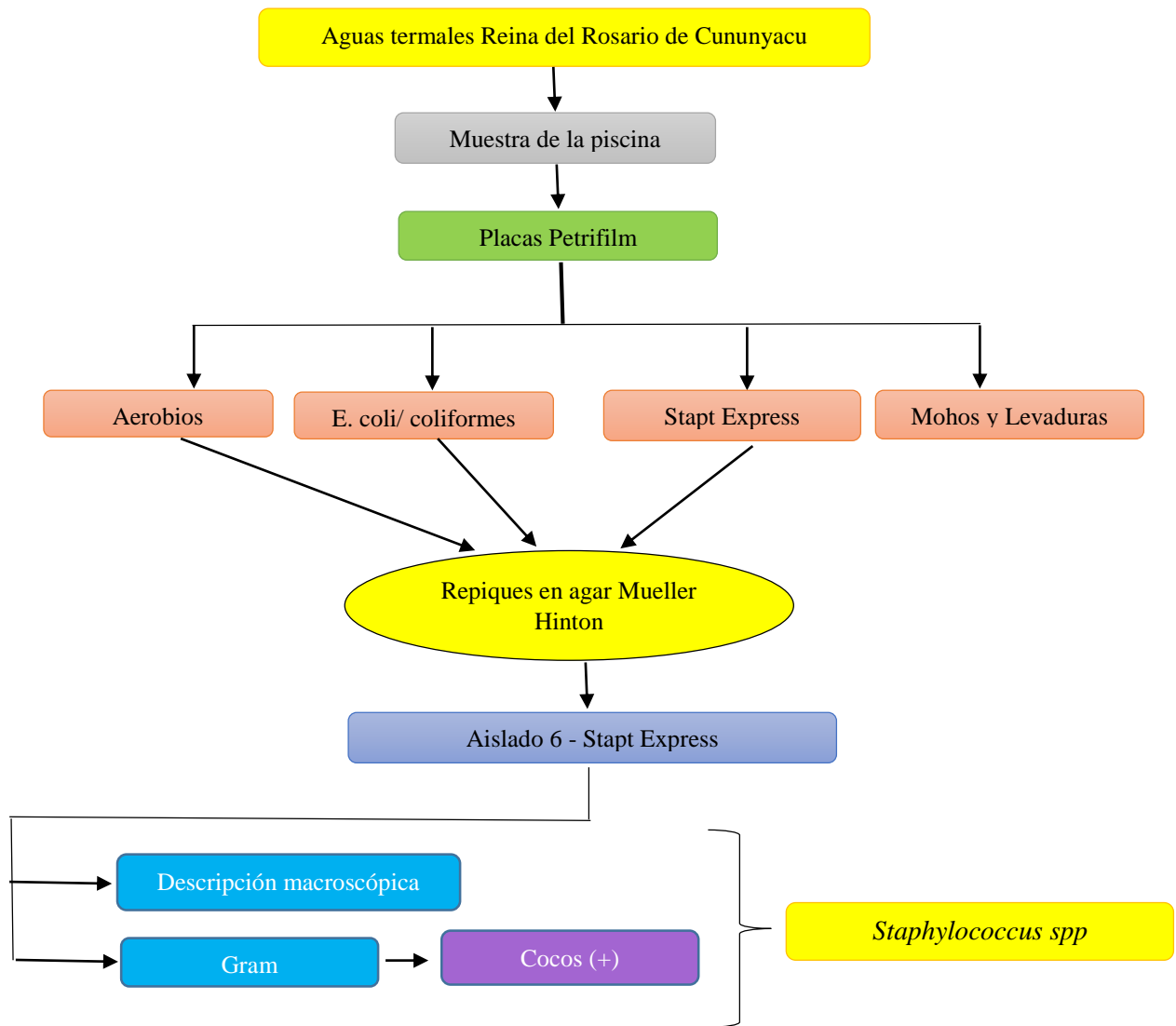
2.4.3 Esquema de identificación de los clones aislados del género y especie *Providencia rettgeri*



2.4.4 Esquema de identificación del clon aislado del género y especie *Escherichia coli*



2.4.5 Esquema de identificación del clon aislado del género *Staphylococcus*



Realizado por: Fernanda Pambabay

CAPITULO III

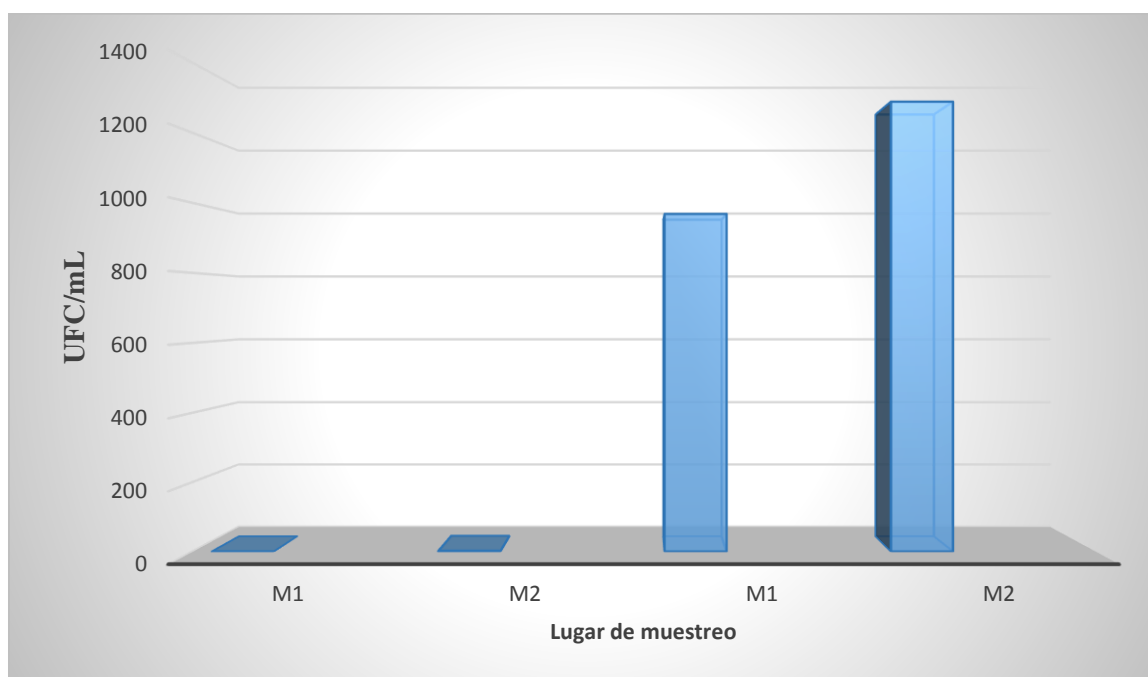
3 MARCO DE ANALISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS

3.1 Recuento de bacterias Aerobias Mesófilas

Tabla 1-3. Recuento de bacterias Aerobias Mesófilas

Lugar de muestreo		Unidades formadoras de colonias (UFC/ml)	media	varianza	Desviación estándar
OJO DE AGUA	M₁	0	1	2	1.41421356
	M₂	2.0			
PISCINA	M₁	968	1128	51200	226.27417
	M₂	1288			
TOTAL		2258	1129	51202	227.68838356

Realizado por: Fernanda Pambabay



Gráfica 1-3. Recuento de bacterias Aerobias Mesófilas

En la primera muestra tomada del ojo de agua y posteriormente sembrada en la placa petrifilm de aerobios mesófilos el resultado es 0 UFC/ml, no así en el segundo muestreo, en esta toma resulta el crecimiento de 2 UFC/ml; para Bernabé Sanz Pérez los resultados menores a 100 UFC/ml no representan un riesgo sanitario indicando que existe una buena protección del ojo de agua. Además del análisis anterior también se debe tomar en cuenta las condiciones que estas aguas ofrecen para el crecimiento bacteriano; según los análisis del INAMHI la temperatura de las aguas termales Reina del Rosario de Cununyaco es 40,30°C, la misma que no es favorable para el desarrollo de las bacterias aerobias mesófilas pues estas crecen a temperaturas no mayores a 37°C. Las 2 UFC/ml que crecieron son producto de la fácil adaptación que tienen estas y otros grupos de bacterias.

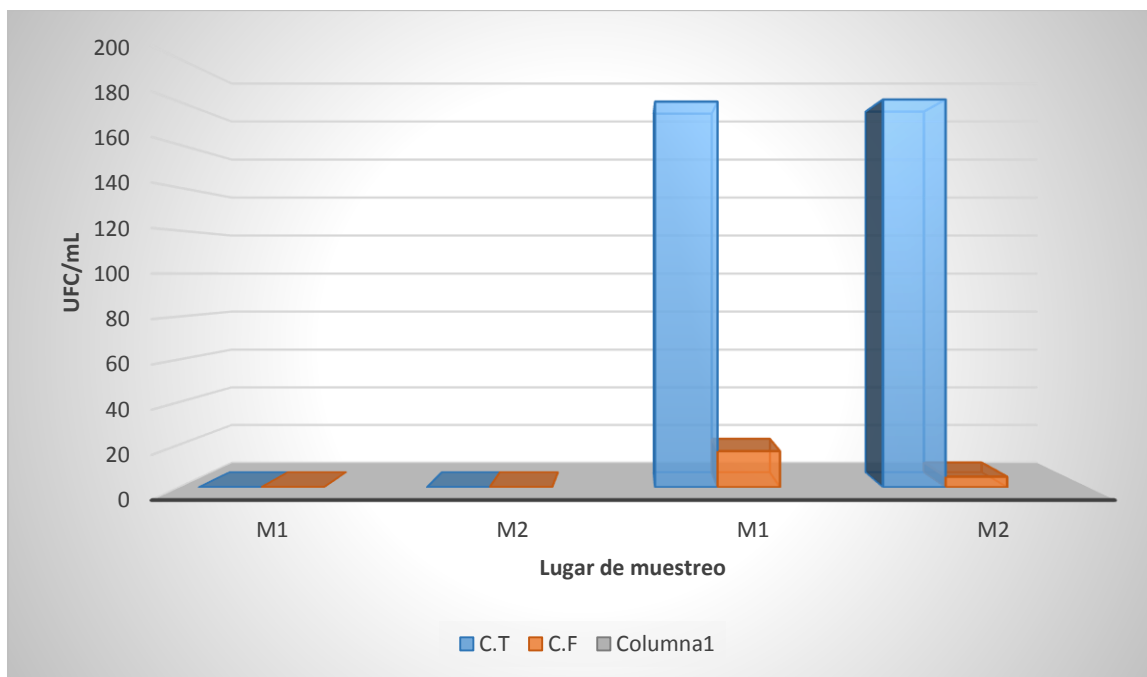
Las piscinas de este balneario están llenas únicamente con el agua proveniente del ojo de agua, la muestra se tomó de una de las piscinas obteniendo los siguientes resultados 968 y 1288 UFC/ml en la muestra uno y dos respectivamente; como es evidente la contaminación en la piscina es alta, esta contaminación se da porque muchas personas hacen uso de estas piscinas sin antes cumplir con las normas de aseo previas para sumergirse en una piscina; además la temperatura del agua a medida que recorre las piscinas va disminuyendo y convirtiéndose en un medio óptimo para el crecimiento de las bacterias aerobias.

3.2 Recuento de bacterias coliformes totales y fecales

Tabla 2-3 Número de bacterias coliformes totales y fecales

Lugar de muestreo		UFC/mL			media	varianza	desviación estándar
		C.T	C.F	T			
Ojo de agua	M ₁	0	0	0	0	0	0
	M ₂	0	0	0			
Piscina	M ₁	180	7	187	186.5	0.5	0.70710678
	M ₂	181	5	186			
Total		361	12	373	186.5	0.5	0.70710678

Realizado por: Fernanda Pambabay



Grafica 2-3. Recuento de bacterias coliformes totales y fecales

Como se observa en la gráfica 2 el resultado del crecimiento en las placas de *E. coli* y coliformes es 0 UFC/ml para las dos muestras tomadas del ojo de agua, con estos datos se puede finalizar que el ojo de agua no presenta ningún tipo de contaminación fecal por lo que no representa ningún riesgo para la salud de los usuarios. (Bernabé Sanz Pérez).

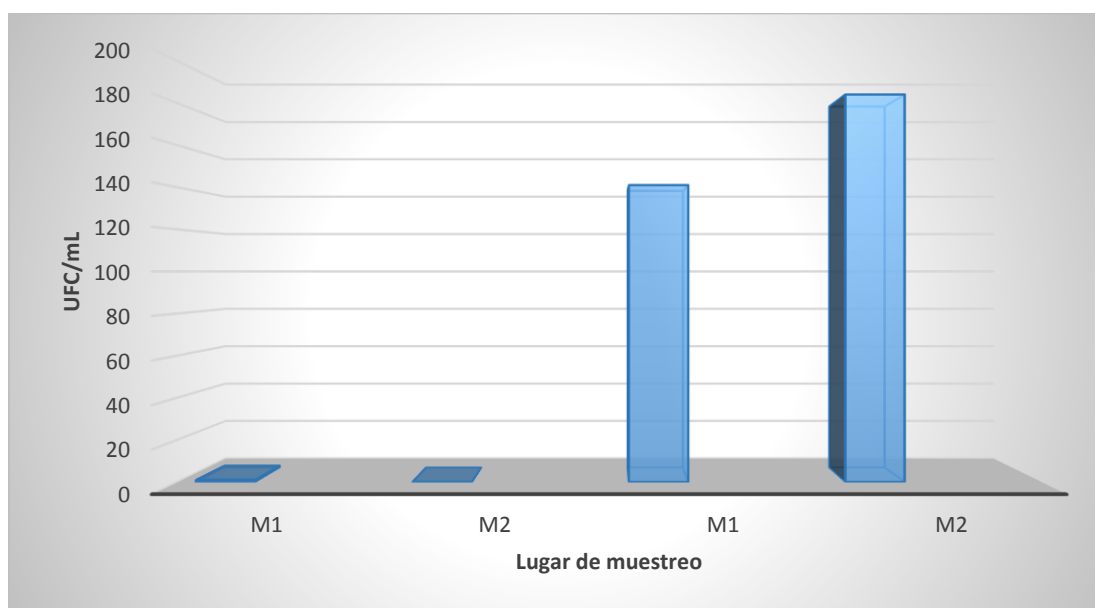
Sacando un total de las dos muestras en la piscina crecieron 383 UFC/ml de las cuales 12 UFC/ml son *E. coli* y las restantes pertenecen al grupo de las coliformes totales. *E. coli* es un indicador de calidad y al estar presente en las aguas de las piscinas nos revela que estas han sufrido contaminación fecal, situación que afectaría a las personas que hacen uso de estas aguas ya sea con fines terapéuticos, de relajación o de aseo; pues al ingresar en ellas la transmisión de esta patógeno sería inmediata. Según los europeos la presencia de *E. coli* en las piscinas no deberían superar las 100 UFC/ml en 100ml; como en nuestro análisis se trabajó con 1ml de muestra se esperaba obtener 1 UFC/ml resultado que no fue así y hace necesario un control microbiológico periódico para evitar que los usuarios contraigan algún tipo de infección. (Antonio L. Doadrio & Mosso y de la Rosa)

3.3 Recuento de *Staphylococcus*

Tabla 3-3 Número de *Staphylococcus*

Lugar de muestreo		(UFC/mL)	Media	Varianza	Desviación estándar
Ojo de agua	M ₁	1	0.5	0.5	0,70710678
	M ₂	0			
Piscina	M ₁	141	162.5	924,5	30,4055916
	M ₂	184			
TOTAL		325	163	925	31.11269838

Realizado por: Fernanda Pambabay



Gráfica 3-3 Recuento de *Staphylococcus*

En la tabla 3 se muestra el crecimiento de 325 UFC/ml en la piscina pertenecientes al género *Staphylococcus*. Este género crece a 37°C y en ambientes salinos, condiciones similares son las que ofrece la piscina para este microorganismo ya que en la toma de muestras la temperatura del agua fue 36.4°C y según los análisis realizados del INAMHI estas aguas son cloruradas sodicas, razón por la cual se favorece al gran crecimiento de estas bacterias, la situación en el ojo de agua

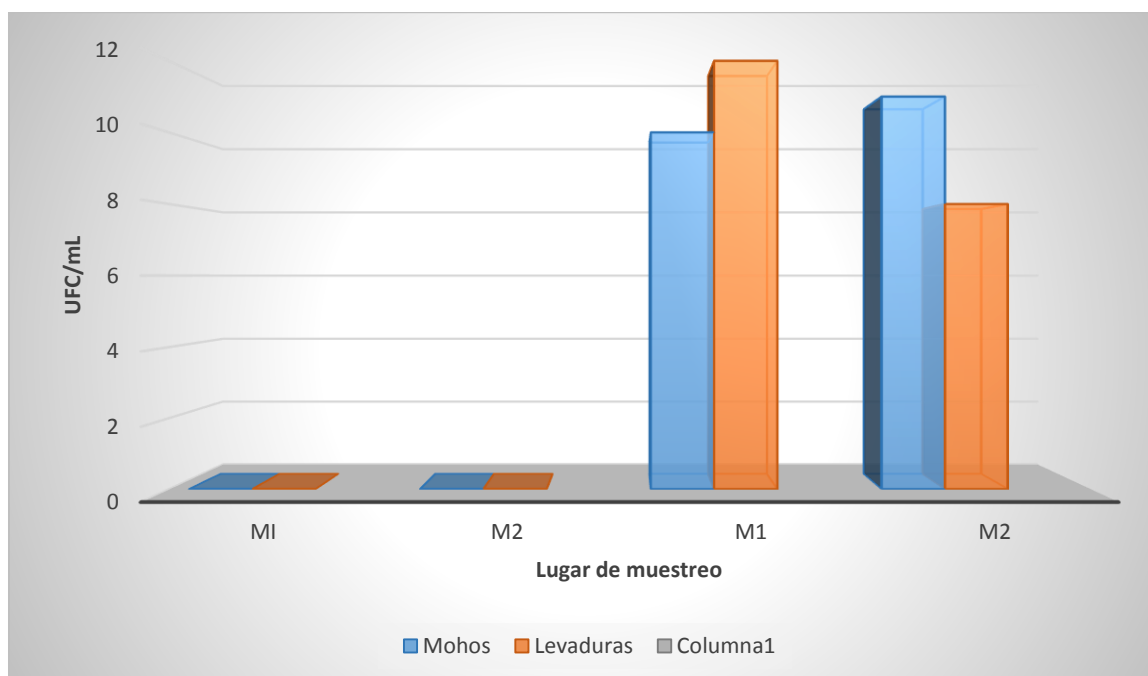
debería ser similar por la concentración de sal, pero solo creció 1 UFC/ml pues la alta temperatura y el hecho que estas aguas no están directamente relacionadas con bañistas hace que el ojo de agua esté libre de estas bacterias. (Doadrio, 2013)

3.4 Recuento de mohos y levaduras

Tabla 4-3 Número de mohos y levaduras

Lugar de muestreo		UFC/mL			Media	Varianza	Desviación estándar
		Mohos	Levaduras	T			
Ojo de agua	M ₁	0	0	0	0	0	0
	M ₂	0	0	0			
Piscina	M ₁	10	12	22	20.5	4,5	2,12132034
	M ₂	11	8	19			
Total		21	20	41	20.5	4.5	2,12132034

Realizado por: Fernanda Pambabay



Gráfica 4-3. Recuento de mohos y levaduras

Como se muestra en la gráfica 4 el resultado del crecimiento de mohos y levaduras en el ojo de agua es 0 UFC/ml puesto que la temperatura del ojo de agua (40.3°C) no favorece el crecimiento de ninguno de estos microorganismos; en cambio el crecimiento en la piscina fue 22 UFC/ml entre mohos y levaduras en el primer muestreo y 19 UFC/ml en el segundo muestreo, el crecimiento de mohos en las aguas minerales no es muy frecuente, pero si han encontrado en varios balnearios de este tipo en España debido a que la mayoría proceden del suelo y luego se adaptan a las condiciones del agua; otra razón de su presencia en la piscina analizada es la contaminación por parte de los bañistas. (De la Rosa, C. et al, 2013).

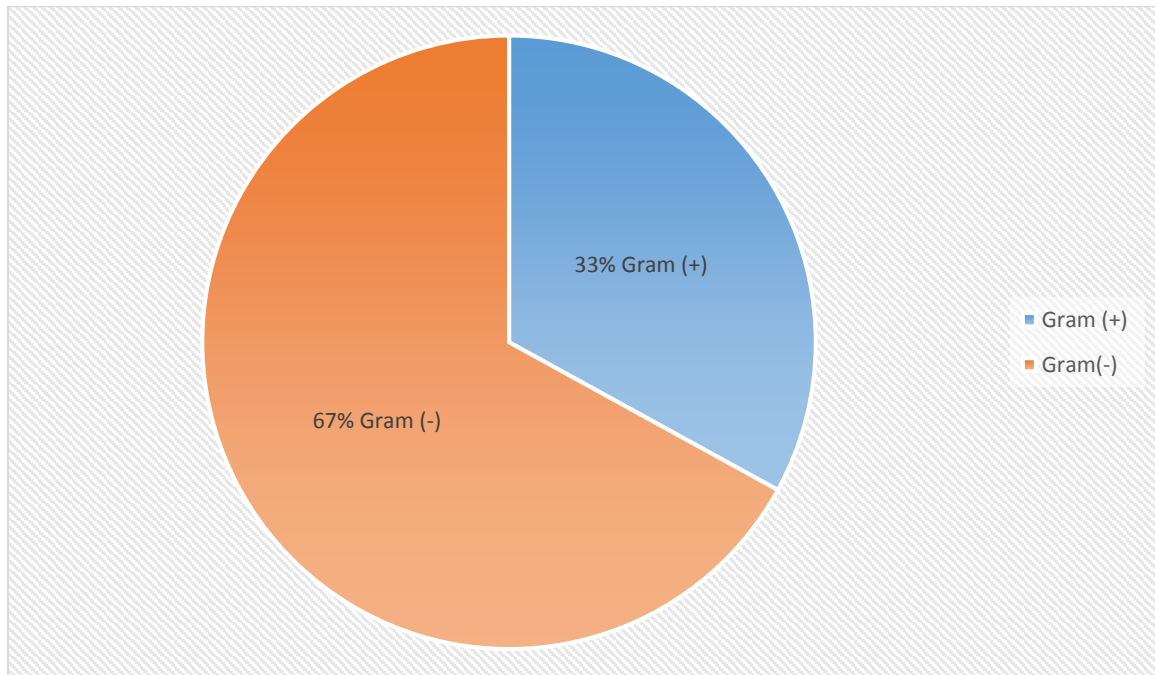
Un estudio sobre piscinas públicas en Irán revela que los agentes fúngicos que predomina en los balnearios son *Trichophyton mentagrophytes* y *T. rubrum* que son los causantes de las tiñas, estos fueron aislados principalmente de los charcos de desinfección de los pies; entonces si la Aguas termales Reina del Rosario de Cununyacu no cuenta con estos charcos es muy probable que estos agentes fúngicos se encuentren en las piscinas. (Babaahmady, et al, 2011)

3.1 Porcentaje de bacterias Gram (+) y de Gram (-)

Tabla 5-3 Porcentaje de bacterias Gram (+) y de Gram (-)

Lugar de muestreo	Tinción GRAM		
	GRAM (+)	GRAM (-)	TOTAL
Ojo de Agua	1	0	0
Porcentaje %	100%	0%	100%
Piscina	1	4	5
Porcentaje %	20%	80%	100%
Porcentaje general %	33.33	66.67	100

Realizado por: Fernanda Pambabay



Gráfica 5-3 Porcentaje de bacterias Gram (+) y de Gram (-)

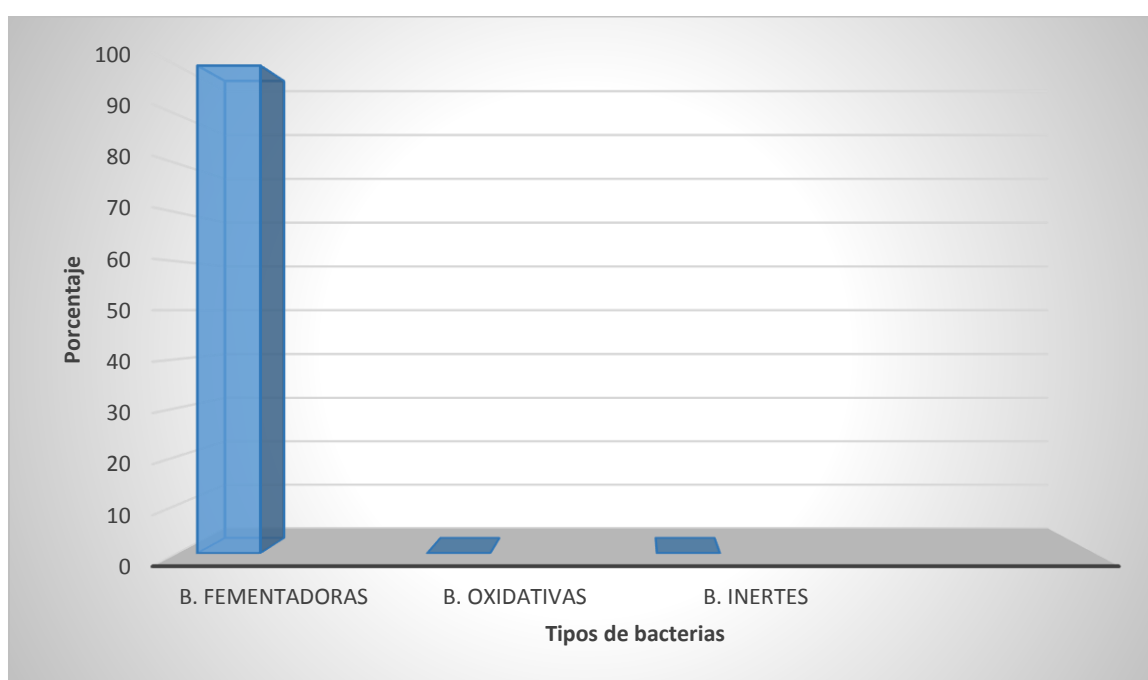
La única unidad formadora de colonia que creció en el ojo de agua pertenece al género *Bacillus*, pues este género resiste altas temperaturas, en un estudio realizado por Ana María Pertierra en microbiología de alimentos nos dice que muchas especies del genero *Bacillus* son esporulados razón por la cual soportan hasta las temperaturas de cocción, este análisis contribuye en nuestro análisis para saber que el clon que creció en el ojo de agua pertenece al género *Bacillus*. En la piscina el resultado fue un 80% para las bacterias Gram (-) y un 20% para las bacterias Gram (+), esto quiere decir que a temperaturas más bajas predominan las bacterias Gram (-); en la piscina la temperatura no es la misma que en el ojo de agua, pues a medida que va recorriendo el agua por las piscinas va disminuyendo la temperatura. Estos datos concuerdan con los analizados por Mosso y col. en 1994 donde determinan que en las aguas hipotermas y mesotermas predominan las bacterias Gram (-) y que en las aguas hipertermas prevalecen las bacterias Gram (+), esta diferencia se debe a la mayor estabilidad de las Bacterias Gram (+) a la temperatura. (Flores, 2013).

3.6 Número de bacterias fermentadoras, oxidativas e inertes.

Tabla 6-3 Número de bacterias fermentadoras, oxidativas e inertes.

Lugar de muestreo	Bacterias Fermentadoras	Bacterias Oxidativas	Bacterias Inertes	TOTAL
Ojo de Agua	0	0	0	0
Piscina	3	0	0	3
PORCENTAJE %	100%	0%	0%	100%

Realizado por: Fernanda Pambabay



Gráfica 6-3 Número de bacterias fermentadoras, oxidativas e inertes.

De los cuatro clones de bacterias Gram (-) a tres se les realizó la prueba del O/F pues el otro clon fue identificado como *E. coli*; los resultados de los tres clones sometidos a esta prueba fue: fermentativos para todos los clones pues estos posteriormente fueron identificados como parte de la familia Enterobacteriaceae, las bacterias de esta familia fermenta la glucosa. En un estudio similar Mosso y colaboradores analizaron dos manantiales minero medicinales en España, encontrando en su mayoría bacterias Gram (-) fermentadora y en menor cantidad las no fermentadoras; ellos afirman que esto es característico en las agua minero medicinales. (Mosso, et al, 2006).

3.7 Mediciones de los parámetros físico-químicos

Tabla 7-3 Parámetros físico-químicos medidos en las Aguas termales Reina del Rosario de Cununyacu (temperatura ambiente del sector es 10-12°C)

Muestras		Temperatura	pH	Conductividad	Solidos Totales
M1	Ojo	40°C	7.8	4519 $\mu\text{s/cm}$	2892.16 ppm
	Piscina	36.4°C	–	–	–
M2	Ojo	39.2°C	–	–	–
	Piscina	34.5°C	–	–	–

Realizado por: Fernanda Pambabay

La temperatura promedio del ojo de agua es 39.6°C y la del ambiente de 10 a 12°C, como se puede observar la temperatura del ojo de agua es más de 5°C superior a la temperatura ambiente por lo que se considera aguas termales; pero dentro de las aguas termales existe una clasificación que es según sus grados de temperatura, aquí el INAMHI ya ha clasificado a estas aguas como hipertermales, la temperatura dada por este organismo es 40.3°C y la obtenida en nuestro estudio es 39.6°C donde la diferencia es mínima por lo que podríamos confirmar que si se tratan de aguas hipertermales. Al observar la temperatura del agua de la piscina podemos decir que disminuye significativamente, pues el agua que sale del ojo pasa por dos piscinas antes de llegar a la piscina de la cual se tomaron las muestras, además como esta agua fluye se va enfriando y formando lo que se llama el gradiente térmico, lo que favorece el desarrollo de una gran variedad de microorganismos. (Flores, 2013)

El pH medido en el ojo de agua fue 7.8, según Flores el pH al cual crecen la mayoría de bacterias está entre 5.5 y 8 por lo que se podría decir que estas termas tienen un pH óptimo para el desarrollo de una gran variedad de bacterias; al hablar de los sólidos totales se podría decir que son aguas con una alta cantidad de sólidos. Con respecto a la conductividad Rodier dice que las aguas que estén entre 200 y 333 $\mu\text{s/cm}$ son aguas de mineralización media y que las que estén entre 666 - 1000 $\mu\text{s/cm}$ son aguas de mineralización importante y que las aguas que superen los 1000 $\mu\text{s/cm}$ son de mineralización excesiva por lo que no pueden ser aptas para el consumo humano; nuestras aguas se ubicarían en este último grupo por eso sería recomendable advertirles a los bañistas que no ingieran estas aguas. Por otro lado el alto contenido de minerales en el agua ayuda al mejoramiento del sistema inmune, regulación de las funciones de las glándulas, relajación mental y producción de endorfinas, todo esto cuando la persona se sumerge en estas aguas, pues ahí el cuerpo está consumiendo minerales. (Sanz, 2009)

3.8 Pruebas realizadas a las bacterias Gram (-)

Tabla 8-3 Pruebas realizadas a las bacterias Gram (-)

Muestras	Oxidasa	Catalasa	O/F	Kligler				SIM		Citrato	Urea
				Glucosa	Gas/glucosa	Lactosa	SH ₂	Indol	Movilidad		
M1	-	+	F	+	+	-	+	+	+	+	+
M2	-	+	F	+	+	-	-	+	+	+	+
M3	-	+	F	+	-	-	-	+	+	+	+
M4 <i>E.coli</i>		+									

Realizado por: Fernanda Pambabay

Por los resultados que presenta M1 se puede decir que es una bacteria perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, específicamente *Proteus vulgaris*; esta bacteria es anaerobia facultativa, oxidasa negativa, catalasa positiva, fermentadora de glucosa, no fermentadora de lactosa, es móvil, produce gas y SH₂. Además es citrato, indol y urea positivo, todos estos datos de bibliografía concuerdan con los datos obtenidos en el análisis, por lo que con un 100% de concordancia se puede afirmar que trata de *Proteus vulgaris*. (Álvarez, et al, 1995).

M2 y M3 también pertenecen a la familia Enterobacteriaceae, como la mayoría de las bacterias pertenecientes a esta familia son fermentadoras de glucosa, catalasa positiva y oxidasa negativa, estas bacterias no son la excepción. Según las reacciones de estas bacterias a las pruebas Kligler, SIM, Citrato y urea se determinó que los dos clones son del género y especie *Providencia rettgeri* con una pequeña variabilidad en la producción de gas para M3, con esta variabilidad M3 es *Providencia rettgeri* con 87% de concordancia y M2 con el 100%. Todos estos resultados han sido comparados con la tabla de características para la diferenciación de especies de la familia Enterobacteriaceae de Álvarez, Boquet y de Fez. (Álvarez, et al, 1995).

M4 es una de las 12UFC/ml que crecieron en las placas petrifilm para el recuento de *E.coli* / coliformes; como estas placas son selectivas para estos microorganismos y las características de crecimiento de las colonias son como las que indica la guía de interpretación (colonias rojas azuladas con formación de gas alrededor) se establecieron que estas colonias son del género y especie *Escherichia coli*; para comprobar se eligió una de estas colonias para realizar la prueba de la catalasa resultando ser catalasa positiva; con este quedo comprobado que se trata de *E. coli*.

3.9 Pruebas realizadas a las bacterias Gram (+)

Tabla 9-3 Pruebas realizadas a las bacterias Gram (+)

Bacterias Gram (+)	Pruebas realizadas			
	Oxidasa	Catalasa	Gelatina	Almidón
M5 (bacilos)	-	+	+	-
M6 (cocos) <i>Staphylococcus</i>				

Realizado por: Fernanda Pambabay

M5 es la única UFC/ml que creció en el ojo de agua, en la tinción Gram fue identificado como bacilo Gram (-) y perteneciente al género *Bacillus*, ya que la prueba de oxidasa y catalasa resultaron igual a las que indica bibliografía; además se realizó la prueba de hidrólisis de almidón y gelatina para bacilos Gram (-) obteniendo que este clon si hidroliza la gelatina mas no el almidón, esto se debe a que no todas las especies del genero *Bacillus* hidrolizan el almidón, así en un estudio realizado por Jeanny Paola Cuervo Lozada en el 2010 encontró que *Bacillus subtilis* hidroliza el almidón y *Bacillus sphaericus* no hidroliza el almidón. (Cuervo, 2010).

Al realizar la observación de M6 al microscopio se determinó que se trataba cocos Gram (+); no se realizó más pruebas confirmatorias puesto que estas colonias fueron extraídas de las placas de Staph Express que es un medio selectivo para *Staphylococcus*. Como el color de las colonias en las placas Staph Express eran azul-verde y no rojo violeta se puede decir que se trata de bacterias del género *Staphylococcus* pero no de la especie *aureus*.

3.10 Bacterias aisladas

Tabla 10-3 Bacterias aisladas

Género	Especie	UFC/ml
<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	12
<i>Proteus</i>	<i>vulgaris</i>	1
<i>Providencia</i>	<i>rettgeri</i>	2
<i>Bacillus spp</i>		1
<i>Staphylococcus spp</i>		325

Realizado por: Fernanda Pambabay

Escherichia coli.- *E.coli* siempre ha sido tomado como índice de contaminación fecal, puesto que grandes cantidades de estas bacterias se encuentran en las heces de humanos y animales de sangre caliente. La presencia de este patógeno en el agua indica que esta ha sufrido algún tipo de contaminación fecal produciendo un riesgo a la salud de los humanos; según la OMS este microorganismo se transmite por el consumo de agua o alimentos contaminados provocando una serie de trastornos en el cuerpo humano como diarrea, vomito, fiebre y cólicos. (OMS, 2015)

Proteus vulgaris. A este microorganismo lo podemos encontrar en el intestino del hombre, en aguas servidas, en el agua, en animales en descomposición, etc. Desde el punto de vista de patogenicidad esta bacteria es causante de infecciones de vías urinarias, debido a que produce ureasa (enzima que desdobla la urea) la urea de la orina se descompone en dióxido de carbono y amoniaco que es un agente toxico para las células humanas provocando irritaciones del epitelio urinario. (Merino y Lösch)

Providencia rettgeri. Al igual que *P. vulgaris* pertenece a la familia Enterobacteriaceae y es un agente patógeno de las vías urinarias. El género de este clon pertenece a la tribu Proteae que es la tribu a la que también pertenece el género *Proteus*, de ahí su similaridad en características bioquímicas, en habitad y en patogenicidad. (Cantón y Sánchez)

Bacillus spp.- Este género habita aguas estancadas y frescas, pertenece a la familia *Bacillaceae* y su principal característica es su capacidad de esporular; sobreviven a ambientes muy hostiles debido a la resistencia que les brinda la endospora. La endospora o también llamada espora es una estructura con vida que soporta a los agentes físico- químicos por lo tanto hace que las bacterias de este género sean resistentes a la esterilización y desinfección. La gran mayoría de bacterias de esta especie no son patógenas ya que se encuentran formando parte de la flora normal del cuerpo. (Macedo, M & Vola, M)

Staphylococcus spp. El género *Staphylococcus* se encuentra disperso en distintos ambientes como: el suelo, el agua, la arena de playa y en una variedad de productos alimenticios; el habitad natural de las bacterias de este género es la piel de los mamíferos, pero también se pueden encontrar en la garganta, tracto intestinal y la boca. Los problemas que puede causar este género una vez invade el organismo va desde una intoxicación alimentaria hasta osteomielitis y neumonía. (Flores, 2013).

CONCLUSIONES

- Las mediciones realizadas in situ del pH temperatura, conductividad y solidos totales fueron medidas con el multiparámetros de Hanna y tienen una mínima variabilidad con los ya establecidos por el INAMHI
- De las bacterias aisladas del ojo de agua y de las piscina el 66.67% son bacterias Gram (-) y el 33.33% son bacterias Gram (+)
- Por medio de las pruebas bioquímicas se logró identificar el género *Bacillus* spp y tres tipos de clones pertenecientes dos al género y especie *Providencia rettgeri* y uno al género y especie *Proteus vulgaris*.
- El desarrollo de clones en los medios selectivos Sthap express y E.coli/coliformes nos ofreció el crecimiento de dos variedades de microorganismos más, como son el género *Staphylococcus* spp y el género y especie *Escherichia coli*.
- Tanto *Proteus vulgaris*, *Providencia rettgeri* y *Escherichia coli*. son bacterias pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae y consideradas como patógenas oportunistas ya que cuando salen de su habitad producen infecciones urinarias, meningitis, neumonía entre otras.

RECOMENDACIONES

- Continuar con este estudio para la caracterización completa de los géneros que no pudieron ser identificados.
- Socializar este estudio con los administradores de las Aguas termales Reina del Rosario de Cununyacu con la finalidad que tomen medidas correctivas sobre los resultados obtenidos. Como primera medidas correctivas se recomienda:
- Hacer obligatorio el ducharse antes de ingresar a las piscinas para evitar contaminar estas aguas puesto que a este balneario acuden muchas personas con el sistema inmune débil como son personas con problemas de salud y niños.
- Realizar el aseo periódico de las piscinas, ya que con un solo aseo a la semana no es suficiente para garantizar que el agua no tenga agentes patógenos que afecte a la salud de los bañistas.
- A estas agua termales acuden muchas personas con dolores de huesos, reumas o con la finalidad de realizar rehabilitaciones, entre otras; entonces si fuera posible se recomendaría destinar una piscina solo para las personas que acuden con estos problemas de salud.

BIBLIOGRAFÍA

1.- **ALVAREZ, V; et al.** *Manual de técnicas en microbiología clínica*. Barcelona-España: Graficard, 1995, pp 74, 128,130,134.

2.- **APELLA M^a C, & ARAUJO, P.** Microbiología del agua. Conceptos básicos. [en línea]
[Consulta: 3 diciembre 2014]. Disponible en:
https://www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/curso/dia_14/4.%20M.%20Cristina%20Apella.pdf

3.- **ARANGO, Carmen.** *Hidrología médica y terapias complementarias* [en línea]. Sevilla-España: A. Pinelo. Camas – Sevilla. 1998. pp.64-68 [Consulta: 3 octubre 2014]. Disponible en:
https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=oci3UApm_sC&oi=fnd&pg=PA17&dq=hidrologia+medica+y+terapias+complementarias&ots=7FecGEExGI&sig=3fNJMm4MUMsti9MTMOz4-71-6wo#v=onepage&q=hidrologia%20medica%20y%20terapias%20complementarias&f=false

4.- *Aspectos microbiológicos*. [en línea] pp. 105-107 Disponible en:
http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3_es_7_fig.pdf

5.- **BABAAHMADY, E.** et al. *Diagnostico fúngico de las piscinas públicas recubiertas*. [en línea] Ilam-Irán: 2011. p. 817. [Consulta: 5 mayo 2015]. Disponible en:
http://salud-publica.es/secciones/revista/revistaspdf/bc5154289fefdb0_Hig.Sanid.Ambient.11.815-819.%282011%29.pdf

6.- **BAILÓN, Lucía, et al.** *Atlas de pruebas bioquímicas para identificar bacterias*. [en línea] México: 2003. pp 11-100. [Consulta: 25 abril 2015] Disponible en:
http://www.academia.edu/4858992/Atlas_de_pruebas_bioquimicas_para_identificar_bacterias

7.- BORJA, Jackelyn , et al. “Bacterias halotolerantes productoras de hidrolasas aisladas de aguas termales de Tarapoto – Perú”. *Ciencias e Investigación*. [en línea], (Perú) Vol. 15. pp. 66-69. [Consulta: 24 septiembre 2014]. Disponible en:

<http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/farma/article/view/2659/2326>

8.- CANTÓN, Rafael , & **SÁNCHEZ, M^a Paz**. *Proteus penneri*. Madrid-España. pp. 1-2. [Consulta: 8 mayo 2015]. Disponible en:

<https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/Ppenneri.pdf>

9.- COSTA, J. *Diccionario de Química Física*. Barcelona–España: Díaz de Santos. 2005. p.15.

10.- DE LA ROSA, M^a del Carmen; & MOSSO, M^a Angeles. *Diversidad microbiana de las aguas minerales termales* [en línea]. Madrid-España. [Consulta: 23 septiembre 2014]. Disponible en: <http://aguas.igme.es/igme/publica/pdfart3/diversidad.pdf>

11.- DOADRIO, Antonio. *Balnearios de España agua minerales y minero medicinales monografía XXXII. El Raposo*. Madrid-España: 2013.

12.- FERNÁNDEZ, Ana; et al. *Procedimientos en microbiología clínica*. España: 2010

13.- 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. Posgrado. Universidad de Los Andes, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Mérida-Venezuela.2013.pp 32-110.

14.- FRANCÉS, M^a C. et al. *Estudios sobre el balneario de Valdelateja (Burgos)*. Madrid-España: 2008.

15.- HOPEY, Michelle. *Aguas termales y Spas en Ecuador*. [en línea] 2011. [Consulta: 23 septiembre 2014]. Disponible en: <http://www.ecuadorexplorer.com/es/html/aguas-termales-y-spas.html>

16.- INAMHI, Aguas Termominerales en el Ecuador. 2013.

17.- *Introducción al termalismo* [en línea]. [Consulta: 29 septiembre 2014]. Disponible en:
http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/rehabilitacionbal/introduccion_al_termalismo.pdf

18.- IZURIETA, Natalia. *Pruebas bioquímicas*. [Consulta: 28 abril 2015]. Disponible en:
<http://es.slideshare.net/nataliaizurieta/laboratorio-no-5-pruebas-bioquimicas-8146300>

19.- LAGARTO, Alicia.; BERNAL, Ingrid.” Utilización terapéutica de las aguas y fangos mineromedicinales”. *Scielo*. [en línea], 2002, vol. 36 n.1. [Consulta: 23 septiembre 2014].
Disponible en:

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152002000100009

20.- “Las piscinas naturalizadas también se contaminan”. *La ciencia es noticia* .2013. [Consulta: 2 junio 2015] Disponible en:

<http://www.agenciasinc.es/Noticias/Las-piscinas-naturalizadas-tambien-se-contaminan>

21.- MACFADDIN, J. *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. [en línea] 3 ed. Buenos Aires – Argentina: Editorial médica panamericana 2003. p. 92
[Consulta: 22 abril 2015]. Disponible en:

<https://books.google.com.ec/books?id=FYWSzy7EjR0C&pg=PA93&lpg=PA93&dq=metabolismo+del+citrato+en+las+bacterias&source=bl&ots=RNMHVjQdPm&sig=z2rVxRVJXUk1AfZqi9tYWQVUls4&hl=es&sa=X&ei=z21aVbTHCuzfsASG4YDwCA&ved=0CCkQ6AEwAg#v=onepage&q=metabolismo%20del%20citrato%20en%20las%20bacterias&f=false>

22.- MACEDO, M & VOLA, M. *Principales grupos de bacilos Gram positivos aerobios*. pp. 339-340. [Consulta: 4 junio 2015]. Disponible en:

<http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/grampositivosaerobios.pdf>

23.- MOLTO, L. *Tipos de aguas minero-medicinales en yacimientos arqueológicos de la península Ibérica.* 1992.

24.- MORA, Darner. “Actualización de los criterios microbiológicos para evaluar la calidad del agua en sus diferentes usos”. *Scielo* [en línea] ,1998, (Costa Rica) vol.7 n.13.[Consulta: 24 septiembre 2014]. Disponible en:

http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-14291998000200003

25.- NEGRONI, Marta. *Microbiología estomatológica. Fundamentos y guía práctica* [en línea] 2 ed. Buenos Aires – Argentina:Médica Panamericana. 2009. pp 12-19 [Consulta: 29 abril 2015] Disponible en:

<http://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=Gxmui-vjZBgC&oi=fnd&pg=PA1&dq=todo+sobre+microbiologia+&ots=QlHBkCB9rT&sig=HL21oPRV MKu3SWldo0BZ97gvJDI#v=onepage&q=todo%20sobre%20microbiologia&f=false>

26.- NTE INEN 1105:1983. *Aguas. Muestreo para examen microbiológico.*

27.- NTE INEN 2169:2013. *Aguas. Calidad del agua. Muestreo y conservación.*

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

29.- NTE INEN 1882:2013. *Agua. Definiciones. 1^{ra} revisión.*

30.- Organización Mundial de la Salud. Guía para la calidad del agua potable. 1^{er} apéndice a la 3^{ra} Ed. 2006.

31.- Objetivo 3. Mejorar la calidad de vida de la población. Plan nacional para el buen vivir 2013 – 2017. Quito - Ecuador. [Consulta: 17 febrero 2013]

32.- PEREX, María Jesús. *Termalismo Antiguo.* Madrid-España: Lerko print, S.A.,1997, pp. 41-46.

33.- PIRES, M. & MOTA, M. *Morfología y estructura bacteriana.* p. 29-37

34.- PRIETO, J. et al. *Microbiología en ciencias de la salud. Conceptos y aplicaciones* [en línea] 3 ed. Barcelona – España: Elsevir. 2011. [27 mayo 2015] pp. 11-19. Disponible en:

<https://books.google.com.ec/books?id=CS1pyvGEwKoC&pg=PA2&dq=definiciones+de+microbiologia&hl=es&sa=X&ei=XswUVdXuFcH9ggS01IH4DQ&ved=0CDMQ6AEwBA#v=onepage&q=definiciones%20de%20microbiologia&f=false>

35.- PUMAROLA, A. *Microbiología y parasitología médica.* [en línea] 2 ed. Barcelona – España: Masson S.A. 1987. [Consulta: 23 abril 2015]. Disponible en:

<https://books.google.com.ec/books?id=Nlego0fDRUQC&pg=PA73&dq=proceso+de+oxidacion+y+fermentacion&hl=es&sa=X&ei=gl5aVfnqEoiHNoWZgWA&ved=0CCQQ6AEwAg#v=onepage&q=proceso%20de%20oxidacion%20y%20fermentacion&f=false>

36.- RACCHUMI, Marco. *Agar Almidón.* [en línea]. Disponible en:

<http://microbiologiamedica.jimdo.com/medios-de-cultivo/medios-comunes/agar-almid%C3%B3n/>

37.- RODÉS, Benito. *Control de Calidad de las Aguas Minero- Medicinales* [en línea] Barcelona-España. 2000 Instituto Tecnológico Geominero de España. pp. 79-80

38.- ROMERO, J. A. *Calidad del Agua.* 3. Ed. Bogotá -Colombia.

39.- ROLLER, D. & ILUM, R. (1986). *Física.* Madrid. (vol. 2)

40.- RODRÍGUEZ, E. et al. *Bacteriología General: Principios y Prácticas de Laboratorio* [en línea] p. 63[Consulta: 25 abril 2015]. Disponible en:

<https://books.google.com.ec/books?id=vwB0fgirgN0C&pg=PA63&dq=pasos+de+la+tincion+gram&hl=es&sa=X&ei=VAtuVcPW18S1ggTFrICACA&ved=0CBsQ6AEwAA#v=onepage&q=pasos%20de%20la%20tincion%20gram&f=false>

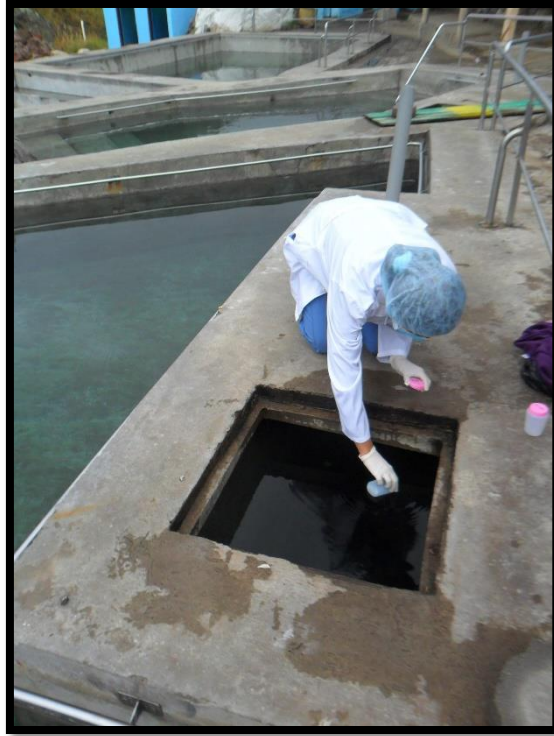
- 41.- SANTAMBROSIO, E. et al.** *Tinción y observación de microorganismos*. Departamento de Ingeniería Química, Facultad Regional Rosario, Universidad Tecnológica Nacional. // 2009.
- 42.- SANTÉ, L.** Petrifilm 3M. Para Recuento de Mohos y Levaduras Cat. 6407, 6417. Francia: Boulevard de l'Oise. 2004.
- 43.- SANTÉ, L.** Petrifilm 3M Placa para el recuento de E. coli/coliformes Francia: Boulevard de l'Oise. 2004.
- 44.- SANTÉ, L.** Petrifilm 3M. Sistema de Recuento Staph Express. Francia: Boulevard de l'Oise. 2004.
- 45.- SANTÉ, L. 3.** Petrifilm 3M. Recuento de Aerobios. Francia: Boulevard de l'Oise. 2004.
- 46.- SANTÉ, L. 3.** Petrifilm 3M. Recuento pseudomonas. Francia: Boulevard de l'Oise. 2004.
- 47.- SOTO, José. , et al.** *Micrométodo para monitoreo sanitario de aguas termales*. [Consulta: 23 septiembre 2014]. Disponible en:
http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/rehabilitacion-bal/micrometodo_para_monitoreo_sanitario_de_aguas_termales.pdf
- 48.- Técnicas de cultivo. Aislamiento. Obtención de cultivos puros.** [en línea]. Granada.2014. [Consulta: 3 mayo 2015]. Disponible en:
<http://www.pomif.com/pages/practicas/bacteriologia/aislamiento>
- 49.- TORTORA, G. et al.** *Introducción a la microbiología*. [en línea] 9 ed. Madrid-España: médica panamericana, 2007. pp. 68-70. // [Consulta: 23 mayo 2015]. Disponible en:
https://books.google.com.ec/books?id=Nxb3iETuwpIC&pg=PA837&dq=microbiologia+del+agua&hl=es&sa=X&ei=9sMUVc3GNcSxggTa_IKYAg&ved=0CBsQ6AEwAA#v=onepage&q=microbiologia%20del%20agua&f=false

50.- VENDRELL, M. C. et al. “Estudio de microorganismos patógenos en la fuente termal de o Tinteiro en Ourense”. *Ciencia y Tecnología Alimentaria* [en línea], 1998, (España) Vol. 2, No. 2. [Consulta: 23 septiembre 2014]. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/724/72420205.pdf>

51.- VIÑAS, F. *Hidroterapia, la curación por el agua*. 4. ed. Barcelona – España: 1994

ANEXOS

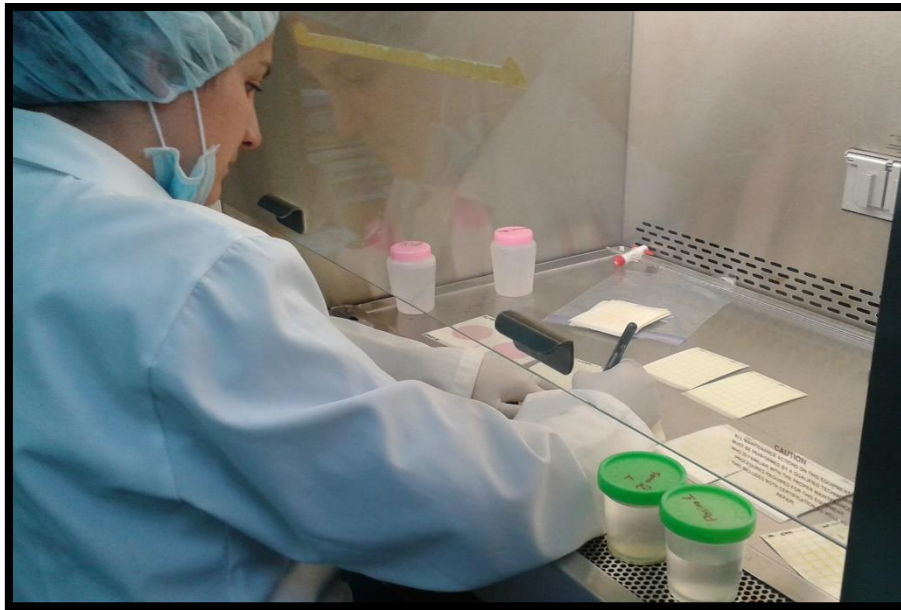
Anexo A: Toma de muestra del ojo de agua



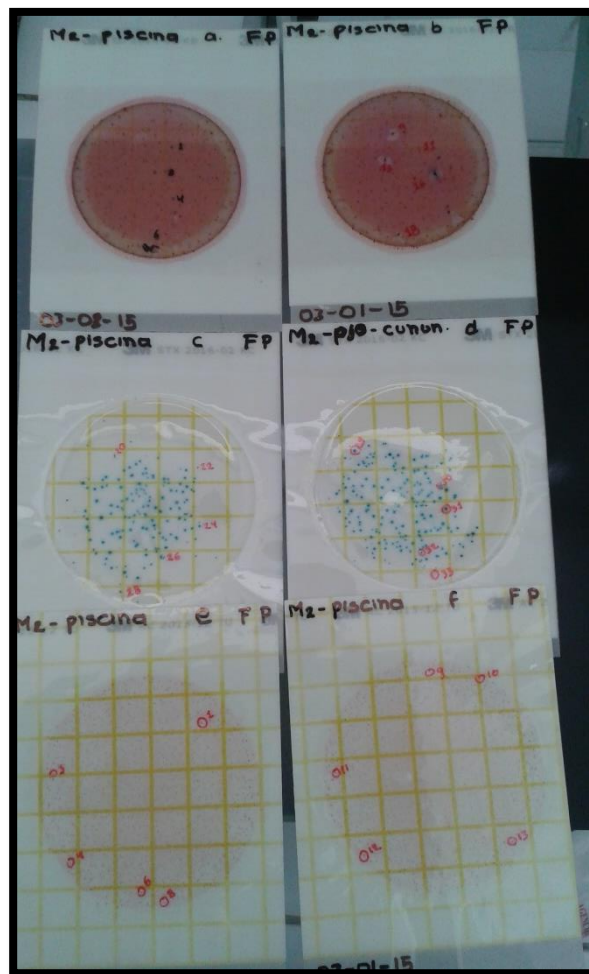
Anexo B: Toma de muestra de la piscina



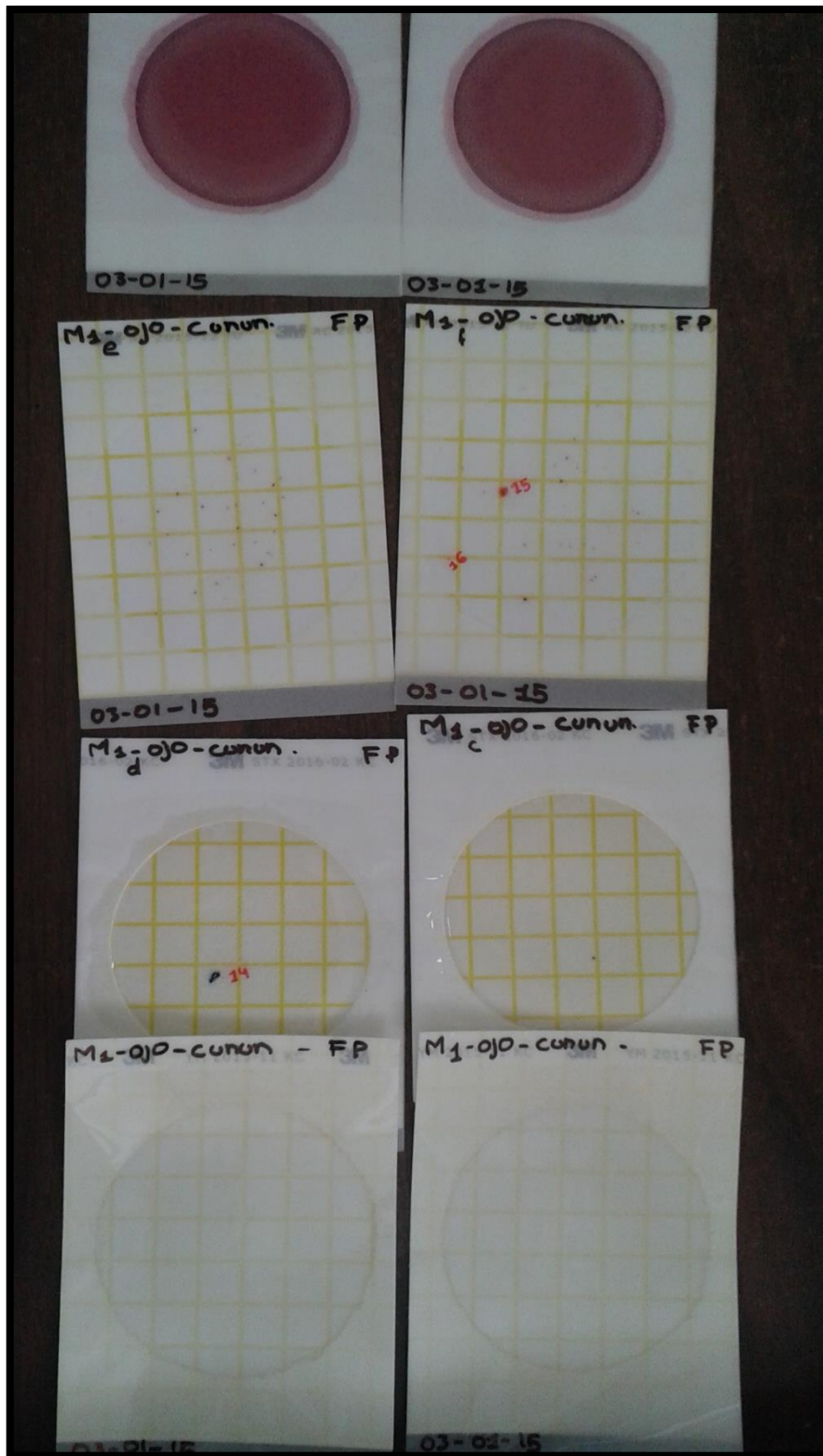
Anexo C: Siembra en placas petrifilm



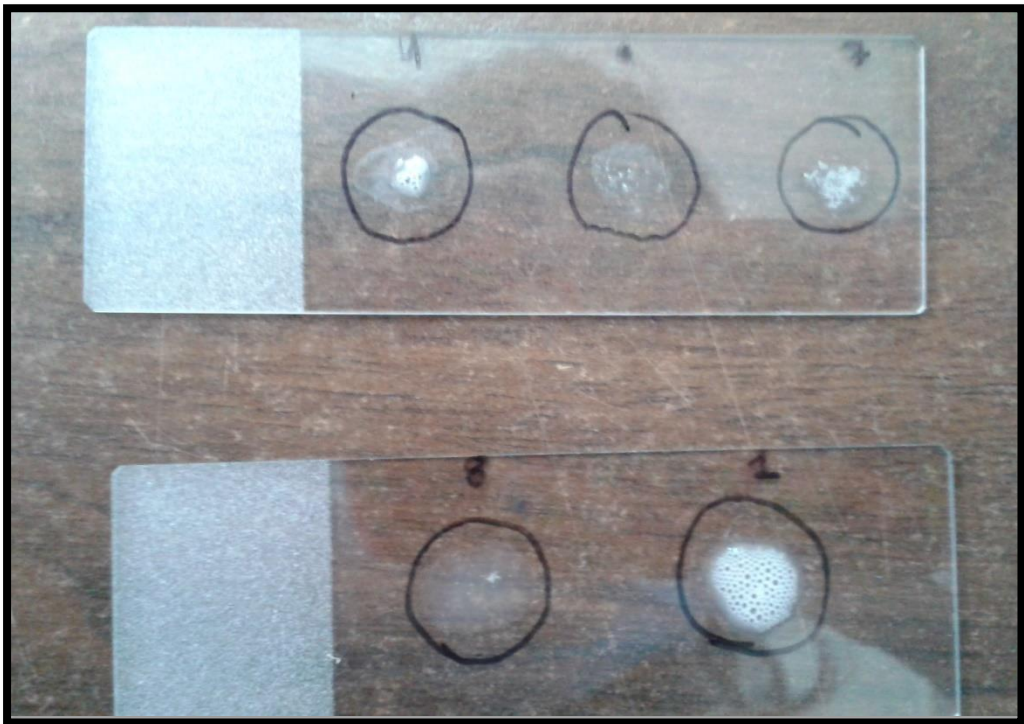
Anexo D: Crecimiento en las placas petrifilm de la muestra tomada de la piscina.



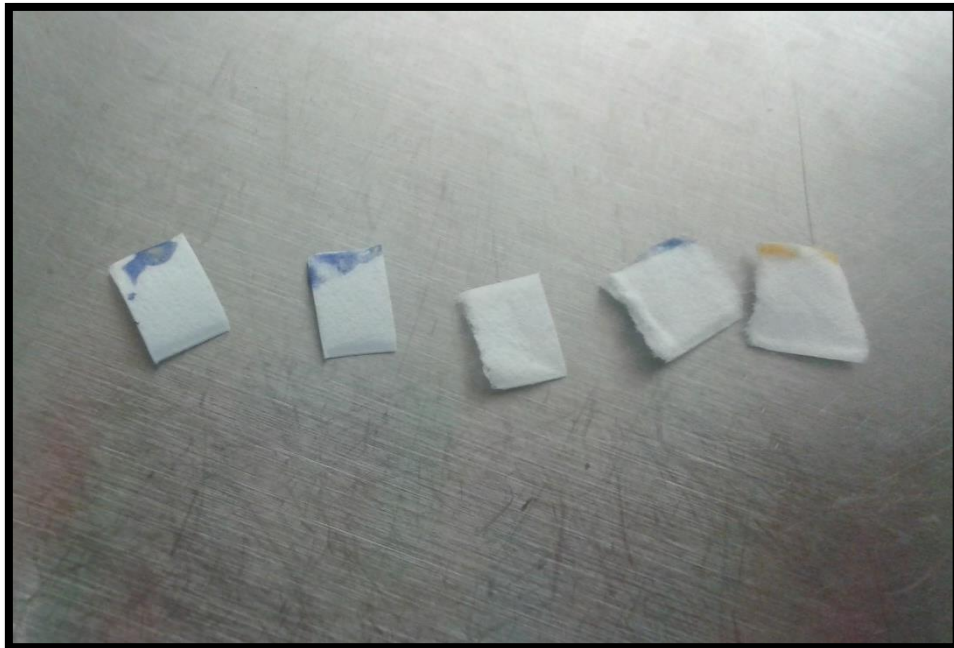
Anexo E: Crecimiento en las placas petrifilm de la muestra tomada del ojo de agua.



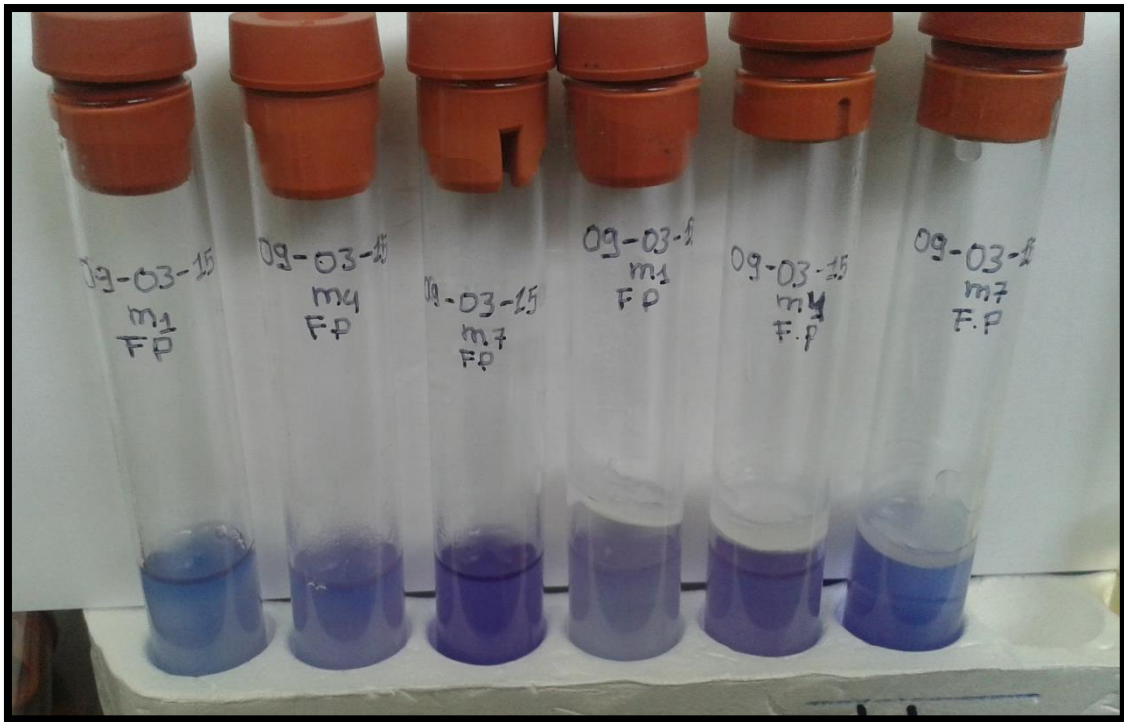
Anexo H: Prueba de la catalasa



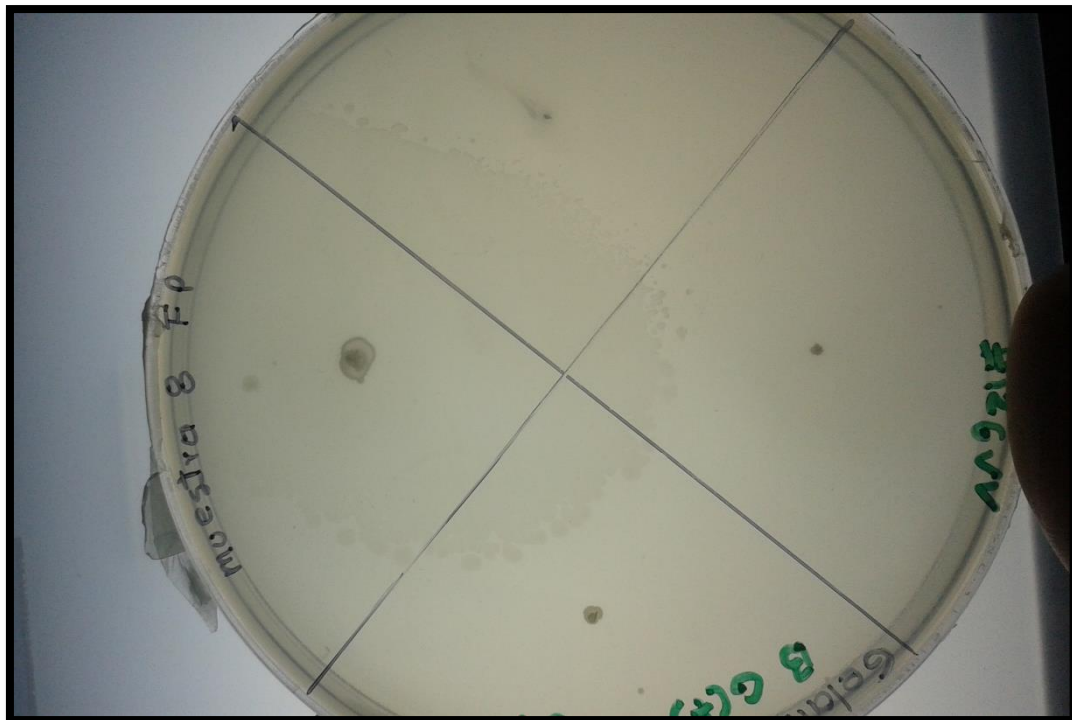
Anexo I: Prueba de la oxidasa



Anexo J: Prueba del O/F



Anexo K: Prueba de la gelatina



Anexo L: Prueba del almidón



Anexo M: Pruebas: Kligler, SIM, Citrato y Urea

