



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

**“EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA DE LAS AGUAS TERMALES
DEL BALNEARIO LAS PEÑAS, CANTÓN BAÑOS, PROVINCIA
TUNGURAHUA”**

Trabajo de titulación presentado para optar al grado académico de
“BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO”

AUTOR: PEDRO JAVIER CABRERA AGUAYO
TUTOR: DR. FÉLIX ANDUEZA

RIOBAMBA- ECUADOR
2015

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

El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que: El trabajo de experimentación: EVALUACION MICROBIOLÓGICA DE LAS AGUAS TERMALES DEL BALNEARIO LAS PEÑAS, CANTÓN BAÑOS, PROVINCIA TUNGURAHUA de responsabilidad del señor Pedro Javier Cabrera Aguayo, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Dr. Félix Andueza

DIRECTOR DE

TRABAJO DE EXPERIMENTACIÓN

.....

BQF. Fausto Contero

MIEMBRO TRIBUNAL

.....

Dr. Gerardo Medina

MIEMBRO TRIBUNAL

.....

DOCUMENTALISTA

SISBIB ESPOCH

.....

NOTA TRABAJO ESCRITO

Yo, Pedro Javier Cabrera Aguayo, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y que los resultados del mismo son auténticos y originales. Los textos constantes en el documento que provienen de otra fuente están debidamente citados y referenciados.

Como autor, asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación.

Riobamba, 02 de Diciembre del 2015

PEDRO JAVIER CABRERA AGUAYO
CI. 0603784539

DEDICATORIA

A Dios, por llenarme de bendiciones, darme la vida y las fuerzas para seguir adelante.

A mi hija, por ser mi inspiración constante.

A mi familia, por todo el apoyo que me ha dado.

Pedro

AGRADECIMIENTO

A Dios.

A mi familia.

Pedro

TABLA DE CONTENIDOS

CONTENIDO	Páginas
INDICE DE CUADROS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE GRÁFICOS	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xii
RESUMEN	xiv
SUMMARY	xiv
INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO I	
1. MARCO TEORICO	2
1.1. Antecedentes de la Investigación	2
1.2. Microbiología	4
1.2.1. Microorganismos	5
<i>1.2.1.1. Morfología bacteriana</i>	<i>5</i>
<i>1.2.1.2. Crecimiento bacteriano</i>	<i>6</i>
<i>1.2.1.3. Cultivo de microorganismos</i>	<i>8</i>
<i>1.2.1.4. Placas Petrifilm</i>	<i>14</i>
<i>1.2.1.5. Observación de las colonias bacterianas</i>	<i>16</i>
<i>1.2.1.6. Identificación Bacteriana</i>	<i>18</i>
<i>1.2.1.7. Sistema de Identificación Microgen</i>	<i>22</i>
1.2.2. Microbiología del agua	24
<i>1.2.2.1. El Agua</i>	<i>24</i>
<i>1.2.2.2. Microorganismos presentes en aguas naturales</i>	<i>25</i>
1.2.3. Aguas Termominerales	31
<i>1.2.3.1. Clasificación</i>	<i>32</i>

1.2.3.2. Aguas Termominerales en el Ecuador.....	35
1.2.3.4. Aguas Termominerales de Tungurahua.....	36
1.2.3.5. Aguas Termominerales “LAS PEÑAS”	36

CAPITULO II

2. MARCO METODOLÓGICO	38
2.1. Características del lugar.....	38
2.2. Diseño dela Investigación	39
2.3. Unidad de Análisis	39
2.4. Población de Estudio.....	39
2.5. Metodología	40
2.5.1. Muestreo.....	40
2.5.2. Pruebas Físico- Químicas in situ (Temperatura, pH, Conductividad y Sólidos Totales).	41
2.5.3. Análisis Microbiológico.....	41
2.5.3.1. Siembra en placas petrifilm.....	41
2.5.3.2. Descripción Macroscópica de colonias.....	43
2.5.3.3. Estabilización del aislado bacteriano	43
2.5.3.4. Tinción Gram.....	44
2.5.3.5. Prueba de la Oxidasa	44
2.5.3.6. Producción de catalasa	44
2.5.3.7. Oxidación- fermentación de la glucosa.....	45
2.5.3.8. Observación de la movilidad.....	45
2.5.3.9. Pruebas Bioquímicas: Kligler, SIM, Urea y Citrato	46
2.5.3.10. Identificación bacteriana.....	49
2.5.3.11. Identificación de bacterias mediante el Sistema de Identificación Bioquímica Microgen TM	50

CAPITULO III

3. MARCO DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	52
3.1. Pruebas Físico- Químicas In Situ.....	52

3.2.	Análisis Microbiológico	53
3.2.1.	<i>Análisis de Bacterias Aerobias Mesófilas</i>	<i>53</i>
3.2.2.	<i>Recuento de Coliformes Totales y Fecales</i>	<i>55</i>
3.2.3.	<i>Análisis de Staphylococcus.....</i>	<i>57</i>
3.2.4.	<i>Análisis de Mohos y Levaduras.....</i>	<i>58</i>
3.2.5.	<i>Bacterias Gram Positivas y Gram Negativa.....</i>	<i>59</i>
3.2.6.	<i>Bacterias Fermentadoras, Oxidativas e Inertes.....</i>	<i>61</i>
3.2.7.	<i>Prueba de Movilidad.....</i>	<i>62</i>
3.2.8.	<i>Pruebas Oxidasa y Catalasa.....</i>	<i>63</i>
3.2.9.	<i>Pruebas Bioquímicas Kligler, SIM, Urea y Citrato.....</i>	<i>65</i>
3.2.10.	<i>Total de pruebas realizadas</i>	<i>66</i>
3.2.11.	<i>Bacterias identificadas por pruebas bioquímicas.</i>	<i>68</i>
3.2.12.	<i>Bacterias identificadas mediante el Sistema Microgen.....</i>	<i>71</i>
3.2.13.	<i>Total de bacterias identificadas en el análisis.</i>	<i>73</i>
	CONCLUSIONES	75
	RECOMENDACIONES.....	76
	BIBLIOGRAFIA	
	ANEXOS	

INDICE DE CUADROS

CUADRO 1-1:	Clasificación de las bacterias según sus requerimientos nutricionales.....	6
CUADRO 2-1:	Determinación del crecimiento microbiano.....	8
CUADRO 3-1:	Características generales de la <i>Escherichia coli</i>	29
CUADRO 4-1:	Características claves de las especies de <i>Methylobacterium</i>	30
CUADRO 5-1:	Características generales del Género <i>Cardobacterium</i>	30
CUADRO 6-1:	Características Generales del Genero <i>Aeromonas</i>	31
CUADRO 1-2	Interpretación de resultados para la prueba de Kligler.....	45

INDICE DE TABLAS

TABLA 1-1:	Aguas Termominerales de la provincia de Tungurahua.....	36
TABLA 1-2:	Coordenadas UTM del Balneario Las Peñas.....	38
TABLA 1-3:	Análisis físico- químico in situ.....	52
TABLA 2-3:	Recuento de Bacterias Aerobias Mesófilas.....	53
TABLA 3-3:	Recuento de Coliformes totales y fecales.....	55
TABLA 4-3:	Recuento de <i>Staphylococcus</i>	57
TABLA 5-3:	Análisis de Mohos y Levaduras.....	58
TABLA 6-3:	Recuento de bacterias Gram positivas y Gram negativas.....	59
TABLA 7-3:	Número de bacterias fermentadoras, Oxidativas e Inertes.....	61
TABLA 8-3:	Recuento de bacterias con Movilidad positiva y negativa de las aguas termales del Balneario Las Peñas.....	62
TABLA 9-3:	Recuento de bacterias Oxidasa y Catalasa positivas y negativas de.....	63
TABLA 10-3:	Resultado de las pruebas bioquímicas Kligler, SIM, Urea y Citrato.....	65
TABLA 11-3:	Descripción completa de las pruebas realizadas a las bacterias aisladas	67
TABLA 12-3:	Bacterias identificadas luego de realizar todas las pruebas descritas en la tabla 11-3.....	68
TABLA 13-3:	Bacterias identificadas por sistema Microgen TM GnA+B-ID.....	71
TABLA 14-3:	Bacterias identificadas en el análisis realizado a las aguas termales del balneario las Peñas.....	73

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1-1:	Morfología de las Bacterias.....	6
FIGURA 2-1:	Técnicas de inoculación de cepas bacterianas.....	14
FIGURA 3-1:	Características observables en una colonia.....	17
FIGURA 4-1:	Diferencias estructurales entre las bacterias Gram positivas y Gram negativas.....	19
FIGURA 5-1:	Esquema de identificación de varios microorganismos usados en laboratorio.....	22
FIGURA 6-1:	Balneario Iónico Balneario “LAS PEÑAS”.....	37
FIGURA 1-2:	Ubicación de las Aguas Termales del Balneario Las Peñas.....	38
FIGURA 2-2:	Esquema del proceso a seguir para realizar el análisis microbiológico.....	39
FIGURA 2-3:	Sitios de muestro de las Aguas termales del balneario Las Peñas.....	40
FIGURA 2-4:	Instrucciones de uso de Placas Petrifilm.....	43
FIGURA 2-5:	Características bioquímicas para la diferenciación de especies bacterianas de la familia <i>Enterobacteriaceae</i>	49
FIGURA 2-6:	Tabla de colores Microgen™ GnA+B-ID System.....	50
FIGURA 2-7:	Ejemplo de la hoja de resultados de Microgen.....	51

INDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1-3:	Recuento de Bacterias Aerobias Mesófilas.....	54
GRÁFICO 2-3:	Recuento de Coliformes totales y fecales.....	55
GRÁFICO 3-3:	Recuento de <i>Staphylococcus</i>	57
GRÁFICO 4-3:	Recuento de Mohos y Levaduras.....	58
GRÁFICO 5-3:	Porcentaje de bacterias Gram positivas y Gram negativas.....	59
GRÁFICO 6-3:	Porcentaje de bacterias fermentadoras, Oxidativas e Inertes.....	61
GRÁFICO 7-3:	Porcentaje de bacterias con Movilidad positiva y negativa de las aguas termales del Balneario Las Peñas.....	62
GRÁFICO 8-3:	Recuento de bacterias Oxidasa y Catalasa positivas y negativas.....	63
GRÁFICO 9-3:	Porcentaje de bacterias identificadas posterior al análisis bioquímico.....	68
GRÁFICO 10-3:	Porcentaje de probabilidad de bacterias identificadas por sistema Microgen™ GnA+B-ID.....	71
GRÁFICO 11-3:	Porcentaje final de Bacterias identificadas en el balneario las Peñas.....	74

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A:	Balneario Las Peñas
Anexo B:	Sitios de Muestreo, ojo de Agua y Psicina
Anexo C:	Medicion de parametro fisico quimico in situ.
Anexo D:	Siembra de muestras en Placas Petrifilm.
Anexo E:	Resultado de la siembra en pLacas Petrifilm.
Anexo F:	Repique de colonias.
Anexo G:	Crecimiento de cepa aisladas.
Anexo H:	Siembra en estría de colonias aisladas.
Anexo I:	Tincion Gram. Bacilos Gram negativos.
Anexo J:	Medio O-F y Pruebas de movilidad.
Anexo K:	Pruebas Bioquimicas: Kliger, SIM, Urea y Citrato.
Anexo L:	Sistema de identificación Microgen GN- ID A+B.
Anexo M:	Reporte de resultados. Sistema de identificación Microgen GN- ID A+B.
Anexo N:	Reporte del Software Microgen ID

RESUMEN

Se ejecutó una Evaluación Microbiológica de las Aguas Termales del Balneario Las Peñas, Cantón Baños, Provincia Tungurahua, con el objetivo de determinar la calidad microbiológica del manantial y garantizar la salud de quienes acuden a este balneario. Se inició con la medición de los parámetros físico- químicos del afluente, usando el multiparámetro de Hannah. El análisis microbiológico se realizó con 2 muestreos del ojo de agua y de la piscina, bajo la Norma INEN 1105. Aguas. Muestreo para examen microbiológico. La identificación microbiana se realizó en placas Petrifilm de Aerobios, *E. coli/ Coliformes*, *Staphylococcus*, mohos y levaduras, usando 1mL de muestra en cada una. Luego de crecidas las colonias, se eligieron a las más representativas para efectuar los repiques necesarios hasta obtener clones puros a los que se les realizó una tinción Gram y las pruebas bioquímicas: oxidasa, catalasa, movilidad y oxido fermentación. A las bacterias que no pudieron ser identificadas se les realizó las pruebas de Kligler, Citrato, Urea y SIM (Sulfuro Indol Movilidad). Y Finalmente las cepas que pese a todos los estudios seguían sin ser identificadas se sometieron al sistema Microgen. El análisis dio como resultado un ojo de agua contaminado con bacterias Gram negativos correspondientes en un 33% a *Cardiobacterium spp* y en un porcentaje similar a *Methylobacterium mesophilicus*. Por su parte la piscina también contaminada con bacilos Gram negativos reportó cepas de *Aeromonas veronni bio veronii*, siendo esta la especie bacteriana con mayor frecuencia de aislamiento. Estableciendo con ello que en estas aguas existe un predominio de bacterias Gram negativas patógenas de interés sanitario, consideradas como indicadores de contaminaciones humanas y ambientales. Se recomienda al Gobierno Autónomo Descentralizado Municipal del cantón Baños realizar análisis microbiológicos periódicos para controlar los parámetros de calidad de las aguas termales del balneario Las Peñas y proteger así la salud de quienes acuden a este complejo turístico.

Palabras claves:

<MICROBIOLOGÍA DEL AGUA> <AGUAS TERMALES> <TEMPERATURA DEL AGUA>
<MICROORGANISMOS DEL AGUA> <CALIDAD DEL AGUA> <BALNEARIO LAS PEÑAS> <BAÑOS [Cantón]> <TUNGURAHUA [Provincia]>

SUMMARY

A microbiological evaluation of the hot Springs Spa Las Peñas, Baños town, Tungurahua Province, in order to determine the microbiological quality of the source and ensure the health of those who come to this resort. It began with the measurement of physical-chemical parameters of the affluent, using multiparameter Hannah. The microbiological analysis was performed with two samples of the water hole and swimming pool, under the standard INEN 1105 Waters. Sampling for microbiological examination. Microbial identification was performed on Petrifilm Aerobic plate, E. coli / Coliform, Staphylococcus, mold and yeast, using 1ml of sample each. After flooding the colonies, they were selected the most representative to make the necessary chimes to obtain pure clones which underwent Gram staining and biochemical test: oxidase, catalase, mobility and rust fermentation. A bacteria that could not be identified underwent test Kligler, citrate, urea and SIM (Sulfide Indole Mobility). And finally the strains that despite all the studies were still not identified were submitted to Mycrogen system. The analysis resulted in a water hole contaminated with Gram negative bacterium corresponding 33% to *Cardiobacterium spp* and similar *Methylobacterium mesophylicus* percentage. Meanwhile the pool also contaminated whit Gram negative strains reported *Aeromonas veronny bio veronny*, this being the most common bacterial species isolation. Thereby establishing that exist in these waters a predominance of Gram negative pathogenic bacteria of sanitary interest, considered as indicators of human and environmental contamination. The decentralized Autonomous Municipal Government of Baños town is recommended to perform microbiological analysis Bathrooms newspapers to control the quality parameters of the thermal spa waters penalties and protect the health of those who come to the resort.

Keywords:

<WATER MICROBIOLOGY> <HOT SPRING> <WATER TEMPERATURE>
<MICROORGANISMS IN THE WATER> <WATER QUALITY> <SPA THE ROCKS>
<BATHROOMS [TOWN]> <TUNGURAHUA [PROVINCE]>

INTRODUCCIÓN

Los balnearios son sitios turísticos concurridos por todo tipo de personas, de ellos existen una infinidad y están ubicados alrededor de todo el mundo, pero solo ciertos países poseen manantiales de Aguas Termales que a más de prestar un servicio turístico, prestan un servicio de medicina ancestral, pues debido a su contenido mineral tienen la propiedad de curar dolencias y malestares.

El Ecuador es uno de los países privilegiados por contener una gran cantidad de termas, gracias a su ubicación geográfica llena de volcanes, aquí una infinidad de personas acuden a estos lugares, pero aunque se han realizado varios estudios sobre las propiedades físicoquímicas de estas aguas, nadie se ha preocupado por realizar estudios que se centren en su diversidad microbiológica, tomando en cuenta que el agua es uno de los medios más comunes para la transmisión de todo tipo de microorganismos.

Por ello establecer un estudio del control de calidad de las aguas termales de nuestro país, es un patrón importante para garantizar la salud de todos quienes acuden a estos lugares, no solo por el hecho de prestar un servicio de calidad, sino además por plasmar lo que dice la constitución de nuestro país que se basa en el Plan Nacional del Buen Vivir, en donde se reconoce el derecho de todas las personas de vivir en un ambiente sano y ecológicamente equilibrado (ECUADOR. 2008. p.57).

Este trabajo se centra en el estudio de las aguas termales del Balneario Las Peñas, Cantón Baños, Provincia Tungurahua, un lugar que al estar en una de las ciudades más turísticas del país es concurrido por una infinidad de gente no solo ecuatorianos sino extranjeros, por lo que del mismo se benefician no solo los habitantes de esta ciudad sino todo el país, pues Baños es un paraíso, potencia turística del país, y por ende este balneario es considerado como uno de los más importantes del Ecuador y por lo mismo está obligado a prestar un servicio de calidad.

Además de todo lo mencionado caracterizando la microbiota de este balneario se mejorara la utilización de este medio natural como una herramienta importante de nuestros saberes ancestrales, y dejar la pauta para que futuros investigadores ahonden más en los recursos genéticos estudiados, ya que de encontrarse microorganismos desconocidos se podrán analizar sus actividades enzimáticas y encontrar en los mismos aplicaciones a nivel industrial y comercial.

CAPITULO I

1. MARCO TEORICO

1.1. Antecedentes de la Investigación

A inicios del siglo XIX Robert Bunsen y Gustav Kirchoff, personas que no tuvieron ninguna relación con las ciencias médicas, fueron los primeros en descubrir la presencia de minerales en los manantiales termales de Dürkheim, Alemania; logrando así varios avances en la hidroterapia. (Salas 2000: p.1).

La Asociación Americana de Salud Publica en el año 1920, realizo las primeras investigaciones sobre la incidencia de enfermedades infecciosas que pueden adquirirse en piscinas y otros lugares de recreación (Salas 2000: p.1).

D. Brock y Louise Brock, en 1971 realizaron un estudio sobre la microbiología de hábitats termales de la región volcánica central, Isla Norte, en Nueva Zelanda; aquí se realizó un estudio para determinar los diferentes microorganismos presentes a diferentes pH y temperatura, tomando especial interés a los microorganismos termo resistentes; dentro de los cuales se encontraron algunas clases de *Phormidium sp.* y *Synechococcus sp.* (Brock., & Brock, 1971: p.235).

Zeikus G, miembro del departamento del departamento de bacteriología de la Universidad de Wisconsin, en 1980 realizó una publicación sobre la Metanogénesis microbiana y su relación con la actividad volcánica en aguas termales en Yellowstone, para ello se emplearon cepas de *Methanobacterium thermoautotrophicum*; donde se demostró que la metalogénesis de se producía a partir de los 70 grados centígrados pero por debajo de los 80 grados, y se correlaciono con la producción de hidrogeno en procesos geotérmicos o fermentación microbiana. (Zeikus., et al. 198: p.433).

Darner Mora Alvarado, en el año 1996 publicó en la revista Costarricense de Salud Pública varios criterios microbiológicos para evaluar la calidad del agua en sus diferentes usos; dentro de este se encuentra el estudio microbiológico de piscinas, incluyendo piscinas normales y termales,

utilizando indicadores microbiológicos tradicionales como son: *Escherichia coli*, estreptococos fecales, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Candida albicans* y nemátodos como *Ascaris* y *Trichuris*. Estos criterios son una guía para el ingeniero sanitario y los trabajadores que laboran con diferentes tipos de aguas, pero sobre todo para los usuarios de dichas aguas. (Mora., 1996. p.25).

Aura Pedroza, miembro del laboratorio del Laboratorio de Biotecnología aplicada de la Pontificia Universidad Javeriana de Colombia, en 1997, publicó en la revista de la Facultad de ciencias de dicha Universidad un diseño para el cultivo discontinuo de cepas autóctonas de *thermus spp*. El mayor logro de este trabajo es el haber diseñado un medio definido para suplir la utilización de agua termal en los experimentos de laboratorio, lo que permitirá adelantar trabajos en la obtención de enzimas termoestables como lipasas, proteasas y amilasas que se encuentran en este tipo de aguas. (Pedroza., et al. 1997. p. 133).

María Mosso Romeo y colaboradores, miembros del departamento de microbiología de la Universidad Complutense en el año 2006 realizaron un estudio sobre la microbiología de los manantiales mineromedicinales del balneario de Cervantes y San Camilo; tomando muestras en tres épocas del año se pudieron encontrar varios microorganismos, la mayor cantidad correspondía a Bacilos Gram negativos, siendo inferior la cantidad de Bacilos Gram positivos; en este estudio no se encontraron residuos fecales ni presencia de microorganismos patógenos. (Mosso, et al., 2006. p. 286).

Francisco Maraver Eyzaguirre, catedrático de hidrología medica de la Universidad complutense de Madrid, en el año 2008; realizo un estudio sobre la importancia actual de la medicina termal, conceptos, clasificación de las aguas mineromedicinales, mecanismos de acción, entre otros. (Maraver., 2008. p.37)

María Mosso Romeo y colaboradores, en el año 2008 realizaron un estudio microbiológico de los manantiales mineromedicinales, Termas y Rio del balneario de Valdelateja (Burgos). Donde se determinó el número de microorganismos totales, bacterias heterótrofas, oligotrofas viables y esporuladas; hubo ausencia de indicadores fecales y microorganismos patógenos. En el estudio también se detectaron microorganismos amonificantes, proteolíticos, algas y hongos entre otros. (Mosso., et al., 2008. p.507).

Mauricio Benavidez de la Universidad Autónoma de Coahuila, junto a sus colaboradores realizaron un análisis de las pozas manantiales y dunas de la reserva ecológica de Cuatro ciénegas, logrando el

aislamiento de microorganismos halófilos que toleran concentraciones del 17% NaCl y cianobacterias, capaces de ser utilizados en procesos biotecnológicos novedosos con fines diversos. (Benavidez: http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/acapulco09/TRABAJOS/AREA_VI/CVI-92.pdf).

Jackelyn Borja, miembro del Laboratorio de Biología molecular de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima-Perú, en el año 2012, realizó un estudio de las bacterias halotolerantes, productoras de hidrolasas, aisladas de las aguas termales de Tarapoto, para la cual se recolectaron muestras y se sembraron en agar tripticosa, Las características de los microorganismos aislados indicaron que al menos existen 6 especies o cepas bacterianas productoras de enzimas hidrolíticas con gran potencial industrial. (Borja., et al. 2012. p.68).

En Ecuador, en el año 2013 Napoleón Burbano y sus colaboradores, miembros del personal del Grupo de Hidrogeología del Subproceso de Estudios e Investigaciones Hidrológicas de la Dirección de Gestión de Hidrología del INAMHI, entrega su publicación Aguas Termominerales en el Ecuador, donde hace referencia sobre el termalismo en el país, clasificando las fuentes inventariadas por provincias, con énfasis en los parámetros físico- químicos. (BURBANO., et al. 2013. p.7).

Es importante resaltar que este estudio realizado por el INAMHI únicamente se refería a la evaluación físico-química, ya que en Ecuador hay muy pocos repotes de análisis microbiológicos de aguas termales.

1.2. Microbiología

La microbiología es la parte de la biología que estudia a los microorganismos, su forma, estructura, fisiología, reproducción e identificación, teniendo por objetivo conocer las actividades beneficiosas y perjudiciales de estos organismos. (Unavarra: http://www.unavarra.es/genmic/microgral/01_morfologia_y_estructura.pdf)

En el campo de la salud esta ciencia se centra en el estudio de los microorganismos dañinos para la salud, es decir estudia las relaciones entre las funciones microbianas y las enfermedades que producen estos microbios en los seres humanos. (De La Rosa., et al. 2011. p.1).

1.2.1. Microorganismos

Los microorganismos son organismos vivos no visibles a simple vista, estos seres pueden ser muy diversos e ir desde células eucariotas quimioheterótrofas cuando poseen membrana y organelos (hongos, algas), hasta células procariotas cuando poseen una estructura relativamente sencilla (bacterias). (De La Rosa., et al. 2011. p.2).

1.2.1.1. Morfología bacteriana

Las bacterias son microorganismos unicelulares que se reproducen por fisión binaria, las diferencias en cuanto a tamaño, forma y estructura esta dado principalmente por el grupo al que corresponden y proporcionan las bases para su estudio e identificación. (MICROBITOS: <https://microbitos.files.wordpress.com/2010/06/morfologia-y-estructura-bacteriana.pdf>).

Tamaño de las bacterias

El tamaño de estos organismos se mide por micrómetros y normalmente oscila entre $1 \times 10 \mu\text{m}$ para bacilos grandes hasta $0.2 \times 0.7 \mu\text{m}$ para bacterias sumamente pequeñas, existiendo variaciones en algunas especies. (Microbitos: <https://microbitos.files.wordpress.com/2010/06/morfologia-y-estructura-bacteriana.pdf>)

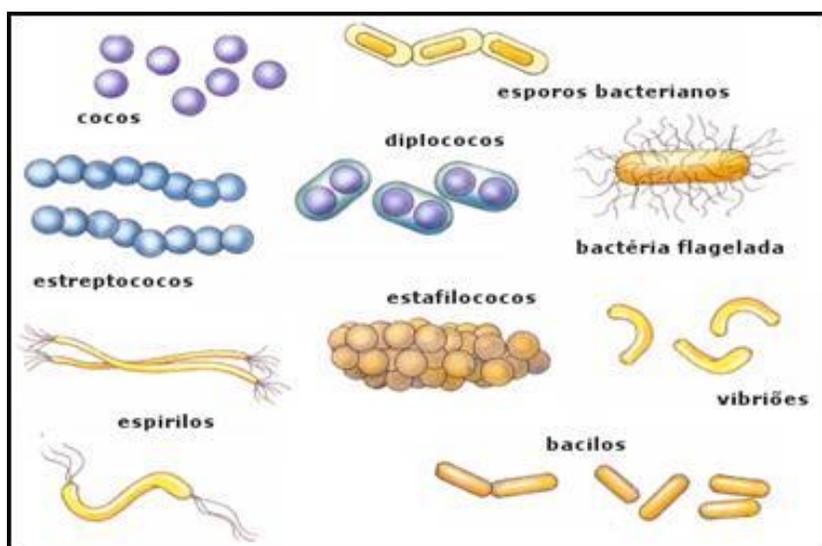
Forma bacteriana

Corresponde a la diferencia más importante entre bacterias y está determinada por la rigidez de su pared celular, existiendo así tres tipos de bacterias claramente distinguibles:

- Cocos: bacterias esféricas muy similares con respecto a su tamaño (diámetro entre $0.6-1.0 \mu\text{m}$). Presentan variaciones comunes de formas lanceoladas, de grano de café y achatadas (cocobacilares).
- Bacilos: bacterias de forma alargada que agrupan una gran cantidad de subtipos morfológicos con gran heterogeneidad bacilar.
- Espirilos: bacterias de forma espirilar, pueden considerarse bacilos torcidos que han adoptado la forma de un hélice. Pueden ser de dos tipos: espiral rígido y espiroquetas (espiral flexible).

(Microbitos: <https://microbitos.files.wordpress.com/2010/06/morfologia-y-estructura-bacteriana.pdf>)

Figura 1-1: Morfología Bacteriana



Fuente: <http://www.monografias.com/trabajos71/biologia-celular-molecular-bacterias>

1.2.1.2. Crecimiento bacteriano

El crecimiento de un microorganismo corresponde al aumento en el número de sus células más no en el tamaño celular. Es decir una célula se transformara en una colonia por medio de fisión binaria. (Fagro:http://www.fagro.edu.uy/~microbiologia/docencia/materiales%20teoricos/2011/crecimiento_2011.pdf).

Para llevar a cabo este proceso y permanecer en estado viable las células requieren de nutrientes que las ayuden a sintetizar sus biomoléculas y adquirir energía. Pudiendo clasificarse según lo indicado en el cuadro 1-1.

Cuadro 1-1: Clasificación de las bacterias según sus requerimientos nutricionales

TIPO	DESCRIPCIÓN	EJEMPLOS
Fotótrofos	Usan la luz como fuente de energía	Algas
Quimiótrofos	Usan como fuente energética compuestos químicos.	<i>Nitrobacter</i> , <i>Enterobacter</i>
Autótrofos	Sintetizan nutrientes a partir de sustancias sencillas.	<i>Clorofitas</i> , <i>Cianofitas</i>
Heterótrofos	Su fuente de carbono es de origen orgánico.	<i>Lactobacillus</i>
Aerobios	Requieren oxígeno para su crecimiento.	
Anaerobios facultativos.	Realizan respiración aerobia o anaerobia según el ambiente en el que se encuentran.	<i>E. coli</i>
Anerobios estrictos	No requieren de oxígeno, pues este les resulta tóxico.	<i>Streptococcus</i>

Fuente: https://www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02_Capitulo_02.pdf.

Tipos de crecimiento

- *Crecimiento individual*: es el tipo de crecimiento en el cual la bacteria llega a un tamaño y peso fijo. Se da previo al proceso de división celular.
- *Crecimiento poblacional*: corresponde al incremento de la cantidad de células como consecuencia del crecimiento y proceso de división celular.

(Diana: http://www.fvet.edu.uy/sites/default/files//microbiolog%C3%ADa/RECUESTO%20BACTERIANO%20bolsa_0.pdf)

Factores fisicoquímicos

Temperatura: de este parámetro depende tanto la conservación como la muerte bacteriana, ya que a temperaturas muy bajas la membrana y el citoplasma microbiano pierden fluidez, y a temperaturas muy elevadas se inactivan los sistemas enzimáticos y desnaturalizan las proteínas provocando la lisis celular, por lo que la temperatura intermedia es la que se considera óptima para el crecimiento bacteriano. (APELLA & ARAUJO: www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02_Capitulo_02.pdf).

- Psicófilos: temperatura óptima baja, ej. *Pseudomonas*
- Mésófilos: temperatura óptima normal. De este tipo son la mayor parte de los microorganismos.
- Termófilos: temperatura óptima alta. Ej. Microorganismos de áreas volcánicas

(Mateos: <http://webcd.usal.es/Web/educativo/micro2/tema07.html>)

pH: los ambientes naturales normalmente tienen un pH que varía entre 7 y 9, aunque algunos pueden crecer en valores superiores o inferiores. Siendo así acidófilos los organismos que crecen a pH inferiores, y alcalinófilos los que crecen a pH superiores. (Apella & Araujo: www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02_Capitulo_02.pdf).

Agua: absolutamente todos los organismos necesitan agua para vivir. Las sustancias absorben en mayor o menor cantidad las moléculas de esta sustancia que no están disponibles para los organismos. La disponibilidad del agua es conocida como potencial de agua (aw) y sus valores varían entre 0-1.

Según las sustancias que absorben el agua, los microorganismos pueden ser:

- Halófilos: cuando viven en altas concentraciones de sal.

- Osmófilos: cuando viven el altas concentraciones de azúcares
- Xerofilos: cuando viven en ambientes secos.

(Mateos: <http://webcd.usal.es/Web/educativo/micro2/tema07.html>)

Métodos de evaluación del crecimiento bacteriano

El conteo del número de células bacterianas que existen en un medio se puede realizar mediante un recuento celular, masa celular o actividad celular, ya sea de manera directa o indirecta, como se describe en el cuadro 1-1.

Cuadro 2-1. Determinación del crecimiento microbiano

Métodos Directos	Recuento del número de células en cámara Peso seco celular Determinación de proteínas totales Determinación de nitrógeno Determinación de ADN
Métodos Indirectos	Recuento de colonias en placa Recuento de colonias sobre fibra de membrana Consumo de oxígeno Liberación de dióxido de carbono Decoloración de un colorante Medida de Turbidez

Fuente: <http://webcd.usal.es/Web/educativo/micro2/tema07.html>

1.2.1.3. Cultivo de microorganismos

El cultivo de microorganismos consiste en la multiplicación de las células de forma controlada, proporcionándoles para ello las condiciones físicas, químicas y nutritivas necesarias.

Medios de cultivo

Como ya se mencionó anteriormente un microorganismo para crecer requiere de ciertos nutrientes que le aporten energía, y de sustancias químicas que le permitan la síntesis de sus constituyentes

celulares, característica que deben tener necesariamente los medios de cultivo, pues de su composición depende el desarrollo del microorganismo a analizar. (Bailón., et al. 2003. p.20).

Clasificación de los medios de cultivo

En función de su composición química:

- Definidos: cuando sus componentes se conocen en su totalidad.

Complejos: cuando su composición no es totalmente conocida puesto que están constituidos por mezclas de extractos materiales complejos como extracto de levadura, de carne, etc. (Unavarra: http://www.unavarra.es/genmic/microgral/01_morfologia_y_estructura.pdf)

En función a su estado físico:

Sólidos: en su composición se incluye un agente solidificante que no es consumible por los microorganismos. Son útiles para el crecimiento aislamiento y obtención de cultivos puros. Estos medios se colocan en cajas Petri, y las células se observan en forma de colonias. (Bailón., et al. 2003. p.20).

Semisólidos: útiles para observar metabolismo, propagación y obtención de bacterias anaeróbicas. (Bailón., et al. 2003. p.20).

Líquidos: conocidos como caldos, ayudan a la difusión del microorganismo, se colocan en tubos y el crecimiento bacteriano se observa por enturbiamiento. (Bailón., et al. 2003. p.20).

En función de los microorganismos que pueden crecer en ellos:

Selectivos: favorecen el crecimiento específico de un determinado microorganismo, mientras se impide el crecimiento de los otros, útiles para el aislamiento de una sepa bacteriana. Ejemplo: el medio SPS para *Clostridios*. (Bailón., et al. 2003. p.20).

Diferenciales: sus componentes permiten diferenciar a simple vista las colonias de un tipo de microorganismo, esto debido a su comportamiento hacia algún nutriente en particular, comúnmente

suele ser un viraje de color provocado por alguna sustancia indicadora. Ejemplo: medios con hemáties permiten identificar microorganismos hemolíticos. (Álvarez., & Boquet., 1990. p. 29).

Medios de identificación: usados para estudiar la acción de un tipo específico de microorganismo frente a un sustrato determinado. Ejemplo: pruebas bioquímicas. (Álvarez., & Boquet., 1990. p. 29).

Medios de multiplicación: tienen una determinada composición respecto a las bacterias para los que estén destinados, permitirán una máximo de crecimiento bacteriano en un mínimo de tiempo, por lo que suelen ser usados en la preparación de vacunas o antibióticos. (Álvarez., & Boquet., 1990. p. 29).

Medios de conservación: favorecen la conservación de los microorganismos, por lo que son usados como medio de transporte de los mismos, su finalidad es mantener a las células en estado viable. (Álvarez., & Boquet., 1990. p. 29).

Principales medios de cultivo

Agar BHI (infusión cerebro- corazón): es un agar muy rico, que puede usarse ya sea en forma de caldo o medio sólido, útil para el crecimiento de una gran variedad de microorganismos. En su composición se incluye la infusión de distintos tejidos animales con el agregado de peptona, fosfato y en menor cantidad glucosa. Su forma en caldo es empleada como medio para hemocultivo y como medio base para varias pruebas metabólicas. (Asignatura.Us: <http://asignatura.us.es/mbclinica/docs/recursos/12/medios-de-cultivo.pdf>).

Agar Chocolate: este medio tiene la misma base que el agar sangre, normalmente la sangre se adicionaba a la base fundida y se producía la lisis celular por aumento de temperatura, lo que le concedía al medio el color chocolate. Actualmente la hemoglobina y demás nutrientes presentes en la sangre se añaden como suplementos en un agar base. (Asignatura.Us: <http://asignatura.us.es/mbclinica/docs/recursos/12/medios-de-cultivo.pdf>).

Agar EMB (eosina, azul de metileno): consiste en un medio diferencial y a la vez selectivo para enterobacterias, esto debido a que el azul de metileno inhibe el desarrollo de bacterias Gram positivas y Gran negativas exigentes, este colorante también se combina produciendo un precipitado a pH ácido, indicando la producción de ácidos. La lactosa incluida en este medio permite

diferenciar a los organismos fermentadores de los no fermentadores, sobre todo a la *Escherichia coli* que es una bacteria fermentadora fuerte de lactosa, y produce colonias negras con un brillo metálico verdoso, cuando una colonia no es fermentadora fuerte forma colonias violeta, y cuando no es fermentadora forma colonias transparentes. (Álvarez., & Boquet., 1990. p. 29).

Agar MacConkey: se trata de un medio selectivo diferencial usado para enterobacterias y bacilos Gram negativos entéricos relacionados. Las sales biliares y el cristal violeta presentes en este medio inhiben el desarrollo de bacterias Gram positivas y Gram negativas exigentes, posee lactosa como única fuente de carbono y como indicador el rojo neutro, provocando que las bacterias fermentadoras de lactosa desarrollen colonias en tonalidades rojas, aquellas que son fermentadoras fuertes provocan una precipitación de las sales biliares debido a la cantidad de ácidos, observada por la aparición de zonas opacas alrededor de las colonias y aquellas que no fermentan lactosa desarrollan colonias transparentes. (Asignatura.Us: <http://asignatura.us.es/mbclinica/docs/recursos/12/medios-de-cultivo.pdf>)

Agar Mueller Hinton: es un medio de cultivo enriquecido desarrollado especialmente para ensayos de sensibilidad que determinan la susceptibilidad de microorganismos hacia los antibióticos. (Álvarez., & Boquet., 1990. p. 29).

Agar nutritivo: consiste en un medio de cultivo sólido que se prepara añadiendo agar a un caldo nutritivo, por ejemplo al agar cerebro-corazón, agar triptona, agar brúcela. (Asignatura.Us: <http://asignatura.us.es/mbclinica/docs/recursos/12/medios-de-cultivo.pdf>).

Agar manitol salado: por su alta concentración de cloruro de sodio es un medio selectivo para *Staphylococcus*. La mayoría de microorganismos no se desarrollan a concentraciones elevadas de sal, salvo el de este género. que al fermentar el manitol forma colonias amarillas propias del *S. aureus*. Los *Staphylococcus* no patógenos que crecen en este medio no lo fermentan y por ende producen colonias rosas. (Álvarez., & Boquet., 1990. p. 29).

Agar Sangre: se trata de un medio muy enriquecido en el cual pueden crecer todo tipo de microorganismos con importancia clínica. Se prepara agregando sangre desfibrilada a un agar base rico. Puede ser considerado también como un medio diferencial puesto que permite observar a contra luz los halos hemolíticos alrededor de las colonias, las cuales pueden ser alfa, beta o gamma hemolíticas. (Asignatura.Us: <http://asignatura.us.es/mbclinica/docs/recursos/12/medios-de-cultivo.pdf>).

Caldo nutritivo: entre sus componentes están el extracto de carne y el cloruro de sodio, los mismos que pueden complementarse con peptona, extracto de levadura o glucosa. (Asignatura.Us: <http://asignatura.us.es/mbclinica/docs/recursos/12/medios-de-cultivo.pdf>).

Técnicas de inoculación

El cultivo de bacterias en un laboratorio debe ser un proceso totalmente estéril, lo que implica el uso de materiales limpios preferentemente de vidrio, como tubos de ensayo, cajas Petri, Erlenmeyer y tubos de fermentación.

Para mantener la esterilidad en el proceso de siembra de un inóculo microbiano se debe tomar las precauciones necesarias que aseguren la pureza del cultivo. Por ello el proceso de inoculación debe realizarse con un hisopo estéril, un asa de cultivo o una aguja de siembra, tomando en cuenta que a las dos últimas hay que calentarlas en una llama a rojo vivo antes y después de la siembra, para eliminar así cualquier tipo de vida en la superficie que pueda provocar una contaminación. (Bailón., et al. 2003. p.20).

Cabe recalcar también que el cultivo bacteriano debe incubarse dependiendo de los requerimientos de cada bacteria, esa es la única manera de lograr un desarrollo adecuado de las mismas, que permitan su observación a simple vista, ya sea como un enturbiamiento en medio líquido o como una colonia en medio sólido. (Bailón., et al. 2003. p.20).

Inoculación en medios sólidos

Placas Petri:

- *Siembra en estría:* puede ser cruzada, masiva o en Z, consiste en sembrar el inóculo diseminándolo de atrás para adelante, en forma de estría, el objetivo es agotar las células hasta obtener colonias aisladas (García., et al. 1994. p.79).
- *Dilución y agotamiento:* en este método, previo a la siembra se efectúa una dilución seriada de la muestra para reducir el número de microorganismos y obtener colonias aisladas fáciles de

estudiar, puede realizarse una o varias siembras a partir de cada dilución y según el microorganismo a estudiar. (García., et al. 1994. p.79).

- *Siembra por inundación*: se deposita toda la muestra directamente sobre la placa, se balancea y se deja reposar por un tiempo para fijarla a la placa. Esta técnica se emplea comúnmente para antibiogramas. (García., et al. 1994. p.80).
- *Siembra por goteo*: la inoculación se realiza con ayuda de una pipeta, produciendo un goteo sobre la superficie del medio. Esta técnica es usada normalmente en muestras con escaso número de bacterias. (García., et al. 1994. p.80).

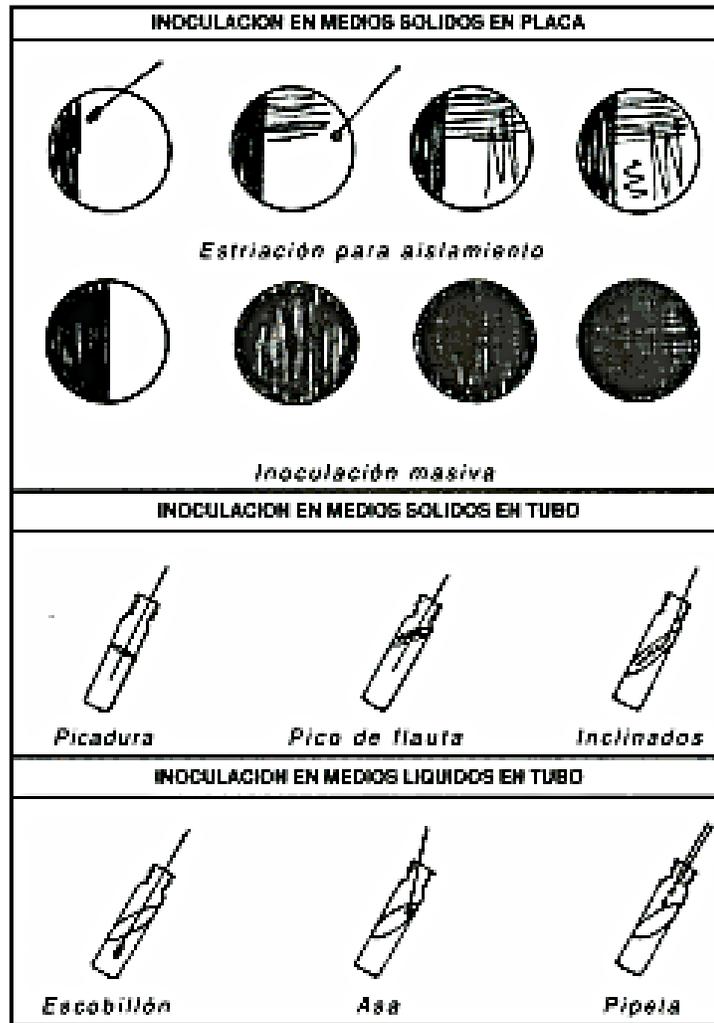
Tubos con agar

- *Tubos con agar semisólido*: constituye un medio adecuado para el desarrollo de bacterias con características como formación de pigmentos. Esta inoculación se realiza con la ayuda del asa o aguja estéril, introduciéndolos hasta la mitad y con un movimiento recto, comúnmente esta siembra se realiza para estudios de motilidad. (García., et al. 1994. p.80).
- *Tubos inclinados o en pico de flauta*: el asa puede insertarse por picadura en la base y realizando una estría en la superficie hasta la parte superior. (García., et al. 1994. p.80).

Inoculación en medios líquidos

Para ello basta dejar caer la muestra con la ayuda de una pipeta estéril, el crecimiento bacteriano se observa como un enturbiamiento, un velo o sedimento. (Bailón., et al. 2003. p.20).

Figura 2-1: Técnicas de inoculación de cepas bacterianas



Fuente: GARCÍA, et al. 1994. p.82

1.2.1.4. Placas Petrifilm

Las Placas Petrifilm son métodos reconocidos por la AOAC INTERNACIONAL (Asociation of Official Analytical Chemist) como Métodos Oficiales de Análisis (OMA). Consisten en medios de cultivo listos para realizar la siembra bacteriana, están compuestos por un film superior plástico recubierto de un adhesivo, indicador y gel soluble en frio; y un film inferior de papel recubierto de plástico con cuadrícula impresa, adhesivo, medio de cultivo estándar y gel soluble en frio, lo que permite llevar a cabo las siembras de forma rápida y reproducible. (3M, Petrifilm. 2014. p.3)

El análisis microbiológico se lleva a cabo en tres etapas muy sencillas:

1.- Siembra: fácil sin necesidad de preparación de medio, solo se levanta el film y se anade la muestra.

2.- Incubación: estas placas por su diseño ocupan muy poco espacio en la estufa.

3.- Interpretación: por los pigmentos indicadores incorporados el recuento se realiza de manera sencilla y en pocos minutos.

(3M, Petrifilm. 2014. p.3)

Beneficios

- Mejora las condiciones de trabajo para los analistas, ya que al taratarse deplacas listas para usar el trabajo se realiza en la mitad del tiempo, aumentando la productividad y organización en el trabajo, con garantía en cada proceso.
- El tamaño compacto de la placa ahorra mucho espacio en el laboratorio y reduce los residuos.
- El proceso de fabricación de estas placas es garantizado, ya que poseen la Certificación ISO 9000 para desarrollo, producción y comercialización, por lo que además están en conformidad con los requerimientos para medios de cultivo.

(3M, Petrifilm. 2014. p.3)

Fundamento

Petrifilm E.coli/coliformes: Esta placa reúne dos ensayos en uno ya que contiene nutrientes de bilis y rojo violeta, un agente gelificante soluble en agua fría, un indicador de la actividad de glucoronidasa y un indicador que hace muy fácil el recuento de colonias. Casi todas las *E.coli* producen β -glucoronidas que produce un precipitado azul, la película superior de la placa atrapa el gas producido por los coliformes y se observa claramente en forma de burbujas. Aproximadamente un 95% de *E.coli* producen gas, observado en las colonias rojas o azules asociadas con el gas atrapado sobre la placa. (3M, Petrifilm. 1998. p.2).

Petrifilm para recuento de Aerobios: esta placa contiene nutrientes presentes en el agar Standards Methods, un agente gelificante soluble en agua fría y un indicador rojo que facilita el recuento de las colonias. (3M, Petrifilm. 1998. p.2).

Petrifilm Recuento Staph Express: esta placa contiene un sistema de medio de cultivo preparado cromogénico de Baird- Parker, modificado, selectivo y diferencial para *Staphylococcus aureus*, microorganismos que se observan formando colonias de color rojo- violeta. (3M, Petrifilm. 2004. p.6).

Petrifilm Mohos y Levaduras: esta placa contiene nutrientes de Sabhi, clorotetraciclina y cloranfenicol, indicador de fosfato, un agente gelificante soluble en agua fría y un indicador que hace más fácil su recuento. Las levaduras se observan comúnmente como colonias pequeñas de color verde azulado, con bordes definidos y sin un centro negro. Los mohos en cambio suelen observarse como colonias muy grandes de color no definido, con bordes irregulares y un foco central. (3M, Petrifilm. 2004. p.8).

1.2.1.5. Observación de las colonias bacterianas

Crecimiento en medio sólido

Cuando existe un crecimiento bacteriano en la superficie de un medio sólido los organismos permanecen fijos formando masas de millones de células que pueden ser observadas a simple vista, masas que se denominan colonias bacterianas y cuyo tamaño puede ser diminuto apenas visible hasta masas de muchos milímetros. (Apella & Araujo: www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02_Capitulo_02.pdf).

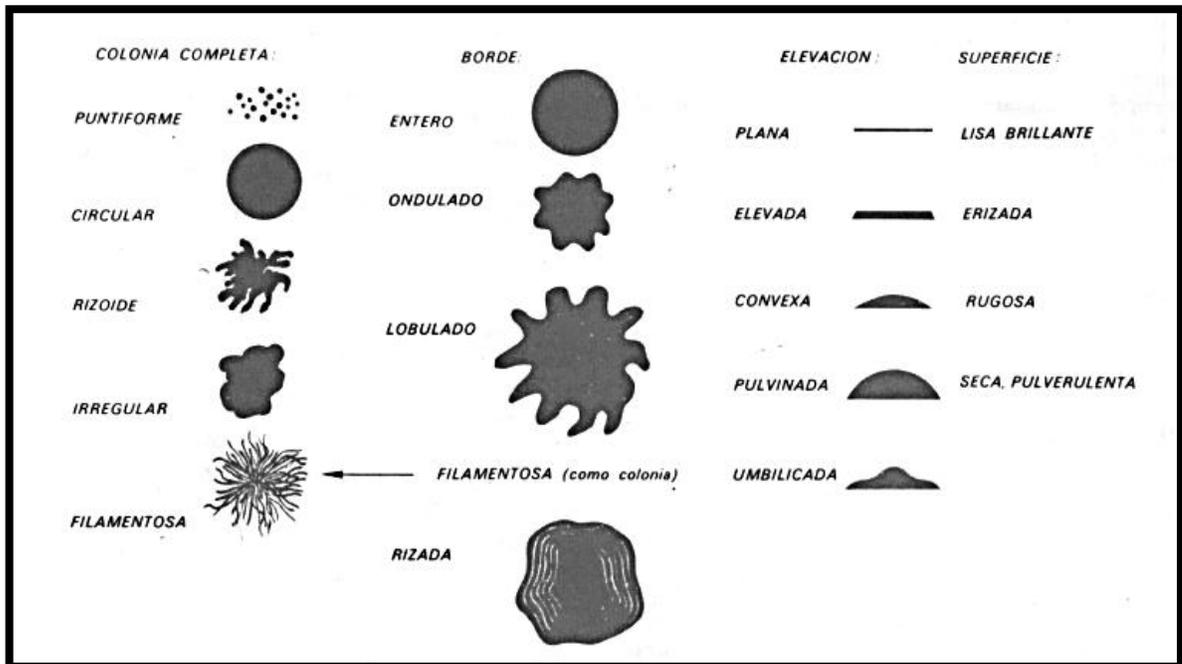
El tamaño, forma, color, textura y olor son en muchos de los casos muy importantes para la identificación bacteriana, esto tomando en cuenta que estas características dependen de la naturaleza del medio de cultivo y las condiciones de incubación, las mismas que pueden ser controladas para proporcionar un valor diferencial a la identificación. (Apella & Araujo: www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02_Capitulo_02.pdf).

Las características más importantes de una colonia bacteriana aislada sobre un medio sólido son:

- *Tamaño*: varía según el tipo de bacteria, aunque normalmente pueden observarse a simple vista, por ejemplo: las colonias de *Streptococcus* son relativamente pequeñas, mientras que las de *Staphylococcus* o bacilos pueden alcanzar hasta 1cm de ancho.
- *Morfología*: normalmente viene dada por su borde y las forma de elevarse en el medio de cultivo, pudiendo ser liso o irregular.
- *Superficie*: si la examinamos sobre luz reflejada la superficie puede tener un aspecto liso brillante a la luz, o rugoso sin brillo. Caracteres que se aprecian claramente en la Imagen 2-1.

(Apella & Araujo: www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02_Capitulo_02.pdf).

Figura 3-1. Características observables en una colonia



Fuente: https://www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02_Capitulo_02.pdf.

Cuando existe un crecimiento bacteriano en tubos con medios sólidos o semisólidos, lo que se observa es el enturbiamiento o cambio de color debido a las características tanto del medio como de la cepa bacteriana aislada.

Crecimiento en medio líquido

Los aspectos a considerar en este caso son la cantidad de crecimiento, el crecimiento en la superficie, la turbidez, y el aspecto del depósito en el fondo del tubo. (Apella & Araujo: www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02_Capitulo_02.pdf).

1.2.1.6. Identificación Bacteriana

La identificación bacteriana normalmente se realiza por medio de métodos convencionales que se basan en las características fenotípicas, ósea observables, siendo estas su morfología, desarrollo y propiedades bioquímicas y metabólicas.

Características microscópicas

La forma de una bacteria puede revelarse con un estudio microscópico tras una tinción, puesto que las tinciones son el primer paso para una identificación.

Las tinciones que se usan comúnmente y son consideradas imprescindibles son la del azul de metileno y la de Gram, esta última muy a menudo es el primer paso a seguir en proceso de identificación. (FERNÁNDEZ, Ana., et al. 2010. p.4)

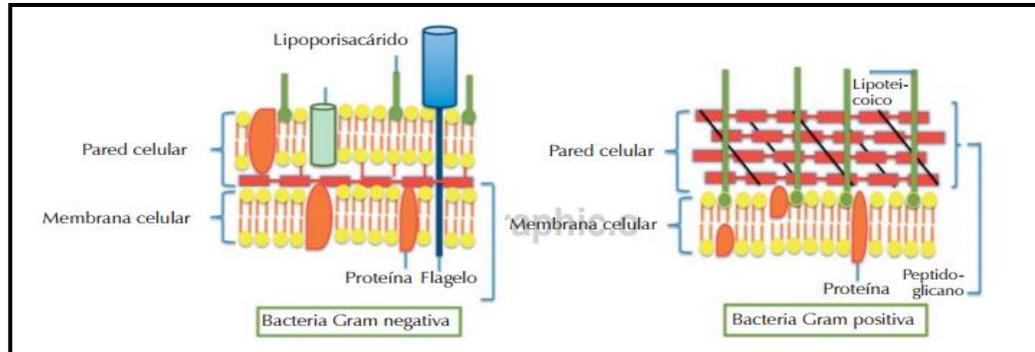
Tinción Gram

Este método fue desarrollado por el científico danés Hans Christian Gram en el año 1884 y actualmente sigue siendo una de las tinciones más usadas a nivel mundial por su sencillez y accesibilidad. La tinción Gram está considerada como un proceso diferencial basado en el uso de dos colorantes y clasifica a las bacterias en dos grupo: bacterias Gram positivas y Gram negativas. (García., et al. 2014. p.12)

Esta tinción se fundamenta en las características de la pared celular bacteriana, la cual le confiere determinadas propiedades a cada microorganismo, siendo así que las bacterias Gram negativas poseen una pared celular constituida por una capa fina de peptidoglicano y una membrana celular

externa, mientras que las bacterias Gram positivas poseen una pared celular muy gruesa formada por peptidoglicano, pero no por una membrana celular externa, diferencias que determinan las características tintoriales de cada grupo de bacterias, como se muestra en la imagen 4-1. (García., et al. 2014. p.13)

Figura 4-1: Diferencias estructurales entre las bacterias Gram positivas y Gram negativas.



Fuente: <http://www.medigraphic.com/pdfs/invdia/ir-2014/ir141b.pdf>

El colorante primario de esta tinción es el cristal violeta, que es un tinte con afinidad al peptidoglicano de la pared bacteriana, posterior a ello se coloca el lugol que es un agente mordiente que impide la salida del cristal violeta, ya que forma un complejo cristal violeta- yodo que llena los espacios del peptidoglicano. La mezcla de alcohol cetona que se coloca después deshidrata la pared celular, cerrando los poros de la misma y destruyendo la membrana externa de las bacterias Gram Negativas la cual es soluble en solventes orgánicos. Las bacterias Gram positivas por su alto contenido de peptidoglicano retienen con mucha fuerza este complejo. Por último la safranina que actúa como colorante secundario sirve para teñir a las bacterias que no pudieron retener el complejo cristal violeta- yodo, es decir tiñe a las Gram negativas, teniendo así como resultado final bacterias Gram positivas tenidas de color morado o azul oscuro y bacterias Gram negativas tenidas de color rosa o rojo. (García., et al. 2014. p.13)

Pruebas bioquímicas

Las pruebas tienen como objetivo la determinación de las características metabólicas de las bacterias que se deseen identificar, estas pueden ser rápidas cuando evalúan la presencia de una enzima preformada y su lectura puede variar desde unos cuantos segundos hasta unas pocas horas:

pero estas pruebas también pueden ser lentas cuando requieren del crecimiento del microorganismo con previa incubación de 18- 48 horas y lo que detectan son componentes metabólicos o sensibilidades a sustancias dadas.

Pruebas preliminares con lectura inmediata

Catalasa: se trata de una enzima presente en la mayoría de células bacterianas que poseen citocromos. Los microorganismos que la sintetizan tienen la capacidad de hidrolizar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno gaseoso que se observa en forma de burbujas. El objetivo principal de esta prueba es diferenciar *Micrococacceaea* de *Streptococcus spp.* y *Enterococcus spp.* (Fernández., et al. 2010. p.6)

Oxidasa: determina la presencia de enzimas oxidasas, la reacción de las mismas se debe a la presencia de un sistema citocromooxidasa que activa la oxidación del citocromo, el cual es reducido por el oxígeno molecular, dando como resultado agua o peróxido de hidrógeno según la especie bacteriana. Generalmente este sistema se encuentra en bacterias aerobias, algunas anaerobias facultativas. Cabe recalcar la presencia de oxidasa está relacionada a la producción de catalasa, la cual degrada el peróxido de hidrógeno producido por la reducción del oxígeno. (Fernández., et al. 2010. p.6)

Pruebas con lectura lenta

Voges- Prokauer: esta prueba tiene como objetivo determinar cuándo un microorganismo fermenta glucosa por vía butanodiólica, esta fermentación se observa por la formación de un complejo de color rojizo con el α - naftol. Es usada comúnmente para la identificación de bacilos entéricos Gram negativos, *Aeromonas spp.*, y *Vibrio spp.* (Fernández., et al. 2010. p.6)

Agar Hierro de Kligler: esta prueba determina varios aspectos:

- La capacidad del microorganismo para metabolizar glucosa o lactosa.
- La producción de gases CO_2 e H_2 como productos finales del metabolismo de los carbohidratos.
- La producción de ácido sulfhídrico SH_2 .

(Fernández., et al. 2010. p.8)

Agar SIM (Sulfuro- Indol- Movilidad): el objetivo de esta prueba es identificar la presencia de la enzima triptofanasa, encargada de degradar el triptófano a indol, observado por la aparición de un anillo rojizo consecuencia de la reacción del entre el reactivo de Kovacs con el indol. Además de ello a partir del tiosulfato de sodio presente en el medio los microorganismos pueden generar ácido Sulfhídrico y debido a las condiciones del agar se puede también detectar la movilidad. (Álvarez., & Boquet., 1990. p. 115).

Citrato: esta prueba usa como medio el agar Simmons Citrato, determina la capacidad que tienen varios microorganismos de usar el citrato como única fuente de carbono, produciendo alcalinidad. (Álvarez., & Boquet., 1990. p. 115).

Urea: el objetivo de esta prueba es determinar si un microorganismos tiene o no la capacidad de desdoblar urea por un proceso de alcalinización producido en el medio y detectado mediante el indicador de pH rojo fenol. (Álvarez., & Boquet., 1990. p. 115).

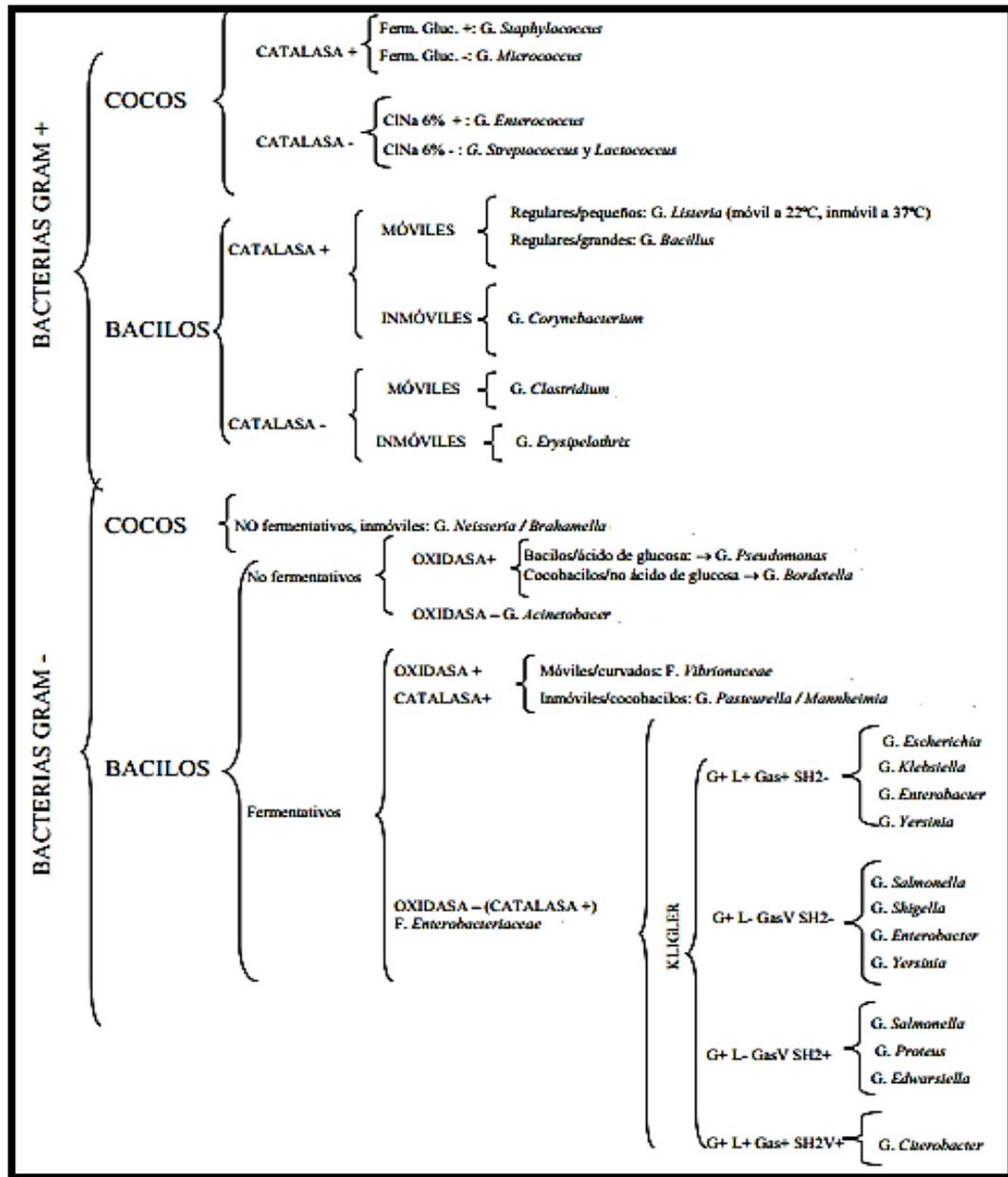
Hidrolisis de Almidón: usa como medio de cultivo el almidón soluble y como reactivo una solución de yodo, el objetivo es determinar la capacidad de algunas bacterias para hidrolizar esta sustancia, reacción que se observa por la aparición de una zona incolora alrededor de la colonia. (Álvarez., & Boquet., 1990. p. 125).

Hidrolisis de gelatina: esta prueba muestra la capacidad que poseen ciertas bacterias para hidrolizar la gelatina a péptidos y aminoácidos por medio de la acción de enzimas gelatinasas. (Fernández., et al. 2010. p.7)

Fermentación de azúcares: muchas bacterias anaerobias o anaerobias facultativas a menudo fermentan carbohidratos transformándolos en ácidos orgánicos y gas (H_2 o CO_2), los mismos que pueden detectarse con ayuda de un indicador de pH. (Fernández., et al. 2010. p.7)

Oxido fermentación: esta prueba tiene como objetivo determinar si los microorganismos utilizan hidratos de carbono por vía oxidativa (en presencia de oxígeno) o por vía fermentativa (en ausencia de oxígeno). (Fernández., et al. 2010. p.7)

Figura 5-1: Esquema de identificación de varios microorganismos usados en laboratorio.



Fuente: https://www.psa.es/webesp/projext/solarsafewater/documents/libro/02_Capitulo_02.pdf.

1.2.1.7. Sistema de Identificación Microgen

El Sistema Microgen consiste en un conjunto de doce substratos bioquímicos estandarizados en micropocillos de microtiltulación, los mismos que se encuentran deshidratados y son seleccionados por medio de un análisis informático de substratos para la identificación del organismo objeto.

(Microgen: <http://www.medica-tec.com/chi/files/MICROGEN-GN-ID-MID64-641-65..pdf>).

La principal ventaja de este sistema es que todos sus sustratos están basados en métodos convencionales, son fáciles de inocular y utilizan un software completo de análisis para la interpretación de resultados. (Microgen: <http://www.medica-tec.com/chi/files/MICROGEN-GN-ID-MID64-641-65..pdf>).

Los sistemas Microgen disponibles en el mercado son:

- Microgen GN-ID™
- Microgen Listeria™-ID
- Microgen Bacillus™-ID
- Microgen™ Staph-ID
- Microgen™ Strep-ID

Microgen GN-ID™

Este sistema contiene dos tiras separadas de micropocillos GN A y GN B. Cada una contiene 12 sustratos seleccionados en función de un análisis informático en base a los datos publicados para la identificación de las Enterobacteriaceae y los microorganismos Gram negativos comunes con prueba de oxidasa positiva y negativa no exigente. Las tiras GN A sirven para la identificación de organismos fermentadores de glucosa oxidasa negativos y las GN A y GN B en conjunto se utilizan para identificar bacilos Gram negativos no exigentes y las especies de la familia Enterobacteriaceae. (Microgen: <http://www.medica-tec.com/chi/files/MICROGEN-GN-ID-MID64-641-65..pdf>).

La inoculación se realiza con una suspensión alcalina de la muestra, si los sustratos son metabolizados se observa un cambio de color durante el periodo de incubación o después de la adición de los reactivos correspondientes. Los resultados pueden ser interpretados usando el software Microgen Identificación MID- 60. (Microgen: <http://www.medica-tec.com/chi/files/MICROGEN-GN-ID-MID64-641-65..pdf>).

1.2.2. Microbiología del agua

1.2.2.1. El Agua

El agua es el líquido natural más abundante en la tierra, los seres vivos están compuestos aproximadamente por un 70% de la misma, con la variación de que los vegetales tienen más agua que los animales y algunos tejidos como el tejido graso tienen menos porcentaje de este líquido.

El agua no es un medio ni una fase inerte, al contrario es un líquido que interviene en la mayoría de reacciones químicas, ya sea como reactivo o como producto, y por ello es indispensable para la estabilidad de varias sustancias biológicas como las proteínas. (Sánchez: <http://www.iespando.com/web/departamentos/biogeno/web/departamento/2BCH/PDFs/02agua.pdf>).

Este líquido es el alimento esencial tanto para animales como para el ser humano, se trata de una molécula sencilla formada por una tomo de oxígeno y dos de hidrogeno (H_2O), unidos mediante enlaces polares que tienen la capacidad de formar puentes de hidrogeno con moléculas contiguas, lo que hace que tenga un elevado punto de fusión y de ebullición, y por ende que se la pueda encontrar en estado líquido a temperatura ambiente.

(Sánchez: <http://www.iespando.com/web/departamentos/biogeno/web/departamento/2BCH/PDFs/02agua.pdf>).

Además de todo ello posee un alto calor específico que la convierten en un regulador de cambios térmicos, puesto mantiene constante la temperatura corporal. Debido a su alto calor de evaporación hace posible la eliminación del calor mediante el sudor. (Carvajal: www.ucm.es/data/cont/docs/458-2013-07-24-Carbajal-Gonzalez-2012-ISBN-978-84-00-09572-7.pdf).

Pero este líquido que es indispensable para la vida, frecuentemente actúa también como una potente fuente de microorganismos y un vehículo de transmisión de organismos entéricos que llegan fácilmente al cuerpo humano si se lo ingiere o si se usa como medio de aseo, convirtiéndolo en un causal de enfermedades. (Apella & Araujo: https://www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02_Capitulo_02.pdf).

Tipos de aguas

Entre los principales tipos de aguas están:

- Agua potable: Agua apta tanto para el consumo humano como el de animales
- Agua dulce: Agua con baja concentración de sales, que previo tratamiento puede ser convertirse en agua potable.
- Agua salada: Agua en la que la concentración de sales es mayor a 10 000mg/L.
- Agua dura: Agua que contiene un elevado número de iones positivos con relación a la cantidad de átomos de calcio y de magnesio de su composición.
- Agua blanda: Agua que posee sus sales disueltas en cantidades mínimas.
- Aguas grises: Aguas residuales de uso doméstico, procedentes del lavado de cocinas, baños, fregaderos y lavaderos.
- Aguas residuales: Aguas procedentes del sistema de alcantarillado.
- Aguas muertas: Aguas que poseen circulación nula y con déficit de oxígeno.
- Agua bruta: Agua que no ha recibido ningún tipo de tratamiento.
- Agua superficial: Agua en estado natural abierto a la atmosfera, es decir agua de ríos, lagos, océanos humedales y mares.
- Agua magmática: Agua que se encuentra a grandes profundidades, y que es impulsada a la superficie debido al movimiento de las rocas.
- Agua subterránea: Agua que se encuentra en las zonas saturadas del suelo.

(Cuido el Agua: <http://www.cuidoelagua.org/empapate/origendelagua/tiposagua2.html>)

1.2.2.2. Microorganismos presentes en aguas naturales

Como ya se mencionó anteriormente el agua es una fuente potente de microorganismos, los cuales pueden tratarse de células eucariotas, es decir algas, protozoarios y hongos; o pueden ser células procariotas, es decir bacterias, incluso pueden encontrarse ciertos tipos de virus. (Apella & Araujo: https://www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02_Capitulo_02.pdf)

Bacterias

De todos los microorganismos presentes en el agua, las bacterias son las de mayor interés clínico e industrial, puesto que más del 80% de las mismas pueden diferenciarse a partir de este líquido vital y por medio de la tinción Gram.

(Apella & Araujo: https://www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02_Capitulo_02.pdf)

Bacterias Gram negativas

De las especies que se han podido aislar en el agua, las más importantes son las pertenecientes a los generos *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Gallionella*, *Enterobacteriaceae*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Bordetella*, *Neisseria*, *Moraxella* y *Acinetobacter*. (Apella & Araujo: https://www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02_Capitulo_02.pdf)

De todas ellas las más comunes son las *Pseudomonas*, esto debido a sus bajos requerimientos nutricionales y a su versatilidad frente a las fuentes de carbono. Estas bacterias son bacilos psicrófilos, es decir se desarrollan a una temperatura entre 15-25⁰ C, son organismos flagelados, producen pigmentos verdes, azules, verdosos, rojos o marrones y no forman esporas, a diferencia de las enterobacterias no fermentan azúcares. De este grupo la más relevante es la *Pseudomonas aeruginosa*, ya que se trata de un patógeno oportunista, causante de infecciones en vías urinarias, intestinos y oídos. Su presencia es habitual en tanques o sistemas de almacenamiento por lo que su control debe ser asiduo, más aun cuando existe déficit de cloración. (Apella & Araujo: https://www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02_Capitulo_02.pdf)

Las *Enterobacteriaceae* son por su parte las más importantes de entre los organismos anaeróbicos facultativos, y su presencia está íntimamente ligada a contaminación fecal, puesto que su hábitat está en los intestinos de los animales. Se trata de bacilos no esporulados, inmóviles en su mayoría y con requerimientos nutricionales muy simples. Se identifican fácilmente por su capacidad de fermentar glucosa por vía glucolítica dando como producto final ácidos. *Escherigia coli*, normalmente localizada en intestinos humanos, es usada como indicador de contaminación fecal en aguas. Otros microorganismos patógenos que forman parte de este grupo son *Shigella* (*Shigella dysenteriae* causante de disentería), *Salmonella* (*Salmonella typhi* causante de tifoidea) y *Klebsiella*, (Apella & Araujo: https://www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02_Capitulo_02.pdf)

Las bacterias del genero *Vibrio*, corresponden a bacilos curvados, anaerobios facultativos y poseen flagelos, lo que las diferencian de las *Pseudomonas*, es su metabolismos no fermentativo. Normalmente se encuentran tanto en agua dulce como en salda. Su principal representante es la *Vibrio Cholerae*, organismo causante del cólera y cuya transmisión se da únicamente a través del agua. (Apella & Araujo: https://www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02_Capitulo_02.pdf)

El género *Neisseria*, aislado comúnmente en sedimentos acuíferos aeróbicos, tiene como causante de gonorrea a la *Neisseria gonorrhoeae* y de meningitis a la *Neisseria meningitidis*. (Apella & Araujo: https://www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02_Capitulo_02.pdf)

Las especies tanto de *Moraxella* como de *Acinetobacter* corresponden a bacilos que se pueden convertir en cocos en senectud, por lo que se los puede denominar como cocobacilos. (Apella & Araujo: https://www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02_Capitulo_02.pdf)

Bacterias Gram positivas

A pesar de que este tipo de bacterias no es muy común en aguas, incluye algunos patógenos humanos procedentes de aguas subterráneas. Los más representativos son los géneros *Micrococcus*, *Staphylococcus* y *Streptococcus*, de los cuales los dos primeros corresponden a bacterias aerobias muy tolerantes a grandes concentraciones salinas, característica que los diferencia de los *Streptococcus*, que incluye al *Enterococcus faecalis*, patógeno humano que habita comúnmente en el intestino del hombre y por ello es considerado indicador de contaminación fecal. (Apella & Araujo: https://www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02_Capitulo_02.pdf)

Tanto el género *Bacillus* como el *Clostridium*, corresponden a bacterias esporulantes de metabolismo aeróbico y anaeróbico respectivamente. Los *Bacillus* normalmente son aislados a partir de suelos acuíferos aeróbicos, de ellos el *Bacillus anthracis* conduce el desarrollo del ántrax; mientras que los *Clostridium* se aíslan a partir de suelos, aguas subterráneas anaeróbicas y del tracto intestinal de animales, de ellos el *Clostridium tetani* ocasiona el tétano. (Apella & Araujo: https://www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02_Capitulo_02.pdf)

Bacterias indicadoras de Contaminación

Por ser el agua un lugar apto para el desarrollo de microorganismos, sus condiciones bacteriológicas son muy importantes desde el punto de vista sanitario, y por ello las normas de calidad a nivel mundial establecen que la misma debe estar libre de patógenos entéricos y parásitos intestinales que puedan provocar la transmisión de enfermedades. Por tal motivo y para evitar un resultado alterado o falsos positivos toda toma de muestra para exámenes bacteriológicos de este tipo debe hacerse con la mayor esterilidad posible desde la toma de muestra hasta el laboratorio, donde el análisis debe ser realizado de inmediato. (Apella & Araujo: https://www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02_Capitulo_02.pdf)

Para considerarse indicadores de contaminación, los microorganismos deben ser fáciles de aislar y cultivar a nivel de laboratorio, y en esas condiciones no deben producir daño al analista, además de ello su presencia en el agua debe estar relacionado cuali y cuantitativamente con otros microorganismos patógenos difíciles de aislar. Según esto, dentro de este tipo de bacterias están: (Apella & Araujo: https://www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02_Capitulo_02.pdf)

Aerobias mesófilas: se trata de bacterias con alto grado de sensibilidad a los agentes de cloración y por lo tanto se usan como indicadores para medir la efectividad de este tipo de tratamientos.

Coliformes: se encuentran en el tracto intestinal de mamíferos y aves, una de sus características principales es su capacidad para fermentar lactosa a 35°. Dentro de este grupo están los géneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter* y *Edwarsella*, géneros que pueden encontrarse como saprofitos independientes, microorganismos intestinales, o como es el caso del genero *Escherichia* que es de origen fecal. Dividiendo así este grupo en coliformes totales cuando se trata de coliformes de cualquier origen; y coliformes fecales cuando son de origen intestinal y tienen la capacidad de fermentar lactosa a 44.5°C. Por ello cuando la contaminación es de origen fecal se le atribuye a las coliformes de este tipo y cuando no se asegura su origen, la contaminación se atribuye a las coliformes totales que se desarrollan a 35°C , y se usan como indicadores complementarios de contaminación fecal. (Apella & Araujo: https://www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02_Capitulo_02.pdf)

En general la bacteria más representativa dentro del grupo de coliformes fecales es la *Escherichia coli*, por su capacidad de producir infecciones en piel y tejidos blandos, diarreas y otras

enfermedades severas. Sus características generales de identificación se muestran a continuación en el cuadro 3-1. (Apella & Araujo: https://www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02_Capitulo_02.pdf)

Cuadro 3-1: Características generales de la *Escherichia coli*

Morfología y tinción	Bacilo Gram negativo
Movilidad	Positiva
Respiración	Aerobios – Anaerobios facultativos
Requerimientos nutricionales	No exigentes
Medio OF	Fermentadores
Catalasa	Positivo
Oxidasa	Negativa
Glucosa	Positiva
Lactosa	Positivas
Citrato	Negativo
Ureasa	Negativa
H₂S	Negativo
Indol	Negativo

Fuente: ACUÑA,, et al. 2002. p.50

Pseudomonas: se trata de organismos presentes comúnmente en el agua y en el suelo. Son bacilos Gram negativos no esporulados, poseen flagelos polares que les permite producir un pigmento fluorescente, son oxidasa positivas, usan la glucosa oxidativamente, no producen gas y son indicadores de deterioro en la calidad del agua. Las especies más importantes de este género son *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. maltophila* y *P. stutzeri*. (ARCOS., et al. 2005. p.74).

Pseudomonas aeruginosa: es una bacteria patógena oportunista , capaz de sobrevivir por mucho tiempo en medio acuoso a temperatura ambiente debido a que no tienen requerimientos nutricionales exigentes. Su presencia no se considera común en aguas, puesto que suele encontrarse en heces humanas y animales y por lo tanto de estar presente en las mismas demuestra que existe contaminación con aguas residuales, debido a ello su control en aguas usadas para turismo recreativo y consumo es obligatorio en muchos lugares del mundo para evitar de este modo el desarrollo de infecciones en oídos, ojos y piel. (ARCOS., et al. 2005. p.74).

Methylobacterium: son bacterias Gram negativas de color rosado, con capacidad de usar el metano en forma facultativa, des este genero se reconocen 14 especies, entre las que tenemos *M. aminovorans*, *M. lusitanum*, *M. radiotolerans*, *M. extorquens*, *M. mesophilicum*, a esta ultima antes se la clasificaba como *Pseudomonas mesophilica*, y es la especie mas aislada de muestras clinicas humanas, son oxidasa positivas y moviles, aunque su oxidasa puede ser muy debil, y la deteccion de movilidad algo complicada, son positivas para catalasa ureasa y amilasa. Ademas esta misma especie es causante de ulceras , infeccion de cateteres centrales, bacteriemia en pacientes inmunocomprimidos sinovitis y peritonitis. (Koneman., & Allen. 2006. p.322)

Cuadro 4-1: Características claves de las especies de *Methylobacterium*

Morfología y tinción	Bacilo Gram negativo
Movilidad	Positiva
Catalasa	Positivo
Oxidasa	Positiva, debil
Glucosa	Positiva
Ureasa	Positiva

Fuente: KONEMAN., & ALLEN. 2006. p.322

Cardobacterium: son bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos, normalmente forman parte de la flora bacteriana de la zona nasofaríngea humana (nariz, garganta y boca), se la relaciona con la endocarditis y se transmite cuando el organismo está expuesto a infecciones diversas, por procedimientos quirúrgicos o dentales, o simplemente por el tracto respiratorio. Sus características de identificación se describen en el cuadro 5-1. (Koneman., & Allen. 2006. p.322)

Cuadro 5-1: Características generales del Género *Cardobacterium*

Morfología y tinción	Bacilo Gram negativo
Movilidad	Negativa
Respiración	Anaerobios facultativos
Medio OF	Fermentadores
Catalasa	Negativa
Oxidasa	Positiva
Glucosa	Positiva
Indol	Positivo

Fuente: <http://es.slideshare.net/ANALISIS/cardobacterium>

Aeromonas: bacilos Gram negativos, aerobios facultativos no esporulantes, sus características son muy similares a las *Enterobacteriaceae*. Este género se divide en dos grupos, el de *Aeromonas Psicrófilas* inmóviles formado por la especie *A. salmonicida*, y el de *Aeromonas mesófilas* móviles peligrosas para la salud humana, formado por las especies *A. hydrolytica*, *A. caviae*, *A. veronii sobria* y *A. veronii verroni*. Bacterias que son comunes en aguas dulces, suelo y muchos alimentos como carne y leche. (BVSDE: http://www.bvsde.paho.org/cd-gdwq/docs_microbiologicos/Bacterias%20PDF/Aeromonas.pdf).

Estas bacterias pueden producir septicemias o infecciones de heridas y aparato respiratorio en personas inmunodeprimidas, también se las relaciona con enfermedades en el aparato digestivo. Su transmisión se asocia al contacto de heridas con suelo contaminado y actividades acuáticas como la natación, el buceo o la pesca. (BVSDE: http://www.bvsde.paho.org/cd-gdwq/docs_microbiologicos/Bacterias%20PDF/Aeromonas.pdf).

Cuadro 6-1: Características Generales del Genero *Aeromonas*

Morfología y tinción	Bacilo Gram negativo
Movilidad	Positiva
Respiración	Aerobios facultativos
Catalasa	Positiva
Oxidasa	Positiva
Glucosa	Positiva

Fuente: <http://www.medigraphic.com/pdfs/micro/ei-2002/ei024f.pdf>

1.2.3. Aguas Termominerales

El origen y definición de las aguas termominerales ha sido siempre motivo de diversas hipótesis. La OMS, en 1969, define Agua Mineral Natural como “*Toda agua bacteriológicamente incontaminada que, procedente de una fuente subterránea natural o perforada, contiene una determinada mineralización y puede inducir efectos favorables para la salud debiendo estar así reconocido por la autoridad competente del país de origen. Las aguas mineromedicinales surgen de lugares especiales relacionados con quebraduras del terreno denominadas fallas o fracturas. Los balnearios con aguas muy calientes suelen estar ubicados en lugares con substrato rocoso compacto, resquebrajado por abundantes fallas que permiten la ascensión relativamente rápida de las aguas poco profundas, impidiendo de esta forma su enfriamiento*” (Bel & Martínez, 1995: p.94).

Se llaman aguas termales a las aguas minerales que salen del suelo a una temperatura mayor en por lo menos 5°C a la temperatura media anual del lugar de donde emanan. Las cuales son ricas en diferentes componentes minerales, la crenoterapia actúa sobre el organismo favoreciendo la homeostasis endocrina y metabólica. Contribuye con ello a exaltar los mecanismos de defensa, equilibrio y adaptación orgánica. El agua es el regulador fisiológico universal, y por ello las curas termales constituyen terapias profundamente naturales. La capacidad curativa depende de la composición química de sus aguas. y permiten su utilización en tratamientos terapéuticos como:

- Baños.
- Inhalaciones.
- Irrigaciones, y calefacción.

(BURBANO., et al. 2013. p.7).

Gran parte de las captaciones termales suelen proceder de profundidades superiores a los dos mil metros. Es la profundidad lo que explica dos de las características fundamentales de las aguas mineromedicinales: la estabilidad de sus propiedades químicas y la regularidad constante del caudal de afloramiento. Tal estabilidad química se explica por la lenta y continua impregnación durante años de las sustancias minerales de cada capa rocosa que atraviesa. (Bel & Martínez, 1995: p.94).

1.2.3.1. Clasificación

La clasificación de las aguas termales y en general de las aguas minerales, no está estandarizada y varía dependiendo del país y del investigador:

Clasificación de las aguas termales de acuerdo a su temperatura

Considerando la temperatura fisiológica indiferente del cuerpo humano, temperatura en la cual no se siente ni frío ni calor, las aguas termales pueden ser clasificadas en:

- Aguas Frías: Aguas con temperaturas menores a 20 °C
- Aguas Hipotermales: Aguas con temperaturas entre 20 y 30 °C
- Aguas Termales: Aguas con temperaturas entre 30 y 40 °C
- Aguas Hipertermales: Aguas con temperaturas mayores a 40 °C

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

Clasificación de las aguas termales de acuerdo a su mineralización global

Considerando su mineralización global, es decir el total de sólidos disueltos en las aguas termales, estas se pueden clasificar en:

- Oligominerales: que contienen sólidos disueltos no superiores a 100 mg/L
- De mineralización muy débil: que contienen sólidos disueltos entre 100 y 250 mg/L
- De mineralización débil: que contienen sólidos disueltos entre 250 y 500 mg/L
- De mineralización media: que contienen sólidos disueltos entre 500 y 1000 mg/L
- De mineralización fuerte: que contienen sólidos disueltos superior a 1000 mg/L

(Termared: http://www.termared.com/docs/repositorio/es_ES/investigacion/aguas-mineromedicinales.pdf)

Clasificación de las aguas termales de acuerdo a su composición

Cuando las aguas termales tienen más de un gramo por litro de mineralización global, la clasificación de las aguas, según su composición, se hace de acuerdo a su contenido aniónico y catiónico predominante:

- *Aguas sulfatadas*: Las sales disueltas son principalmente sulfatos (SO₄). La absorción de azufre bivalente a través de la piel produce un enriquecimiento del mismo en las estructuras articulares, mejora la vascularización interviniendo en procesos de oxidación-reducción y forzando el tropismo tisular. Su mineralización es elevada y su sabor amargo. Suelen ser utilizadas como laxantes, diuréticas, en alteraciones intestinales y gastritis.
- *Aguas Cloruradas*: Sus sales principales son cloruros (Cl). Suelen provenir de una circulación profunda por las capas de sal de períodos geológicos muy antiguos. Aumentan las defensas de la piel y se utilizan en alteraciones ginecológicas, lesiones musculares, traumatismo óseo y como estimuladoras de la función gástrica, hepática y biliar.
- *Aguas bicarbonatadas*: Presentan en su composición bicarbonatos que pueden ser cálcicos o sódicos. Las aguas bicarbonatadas cálcicas tienen una agradable ingestión y se utilizan en procesos digestivos. La mayor parte de las aguas embotelladas son bicarbonatadas cálcicas y su origen procede de la penetración de las aguas por capas de rocas sedimentarias con una alta proporción de caliza. Las *bicarbonatadas sódicas* tienen un origen distinto. Están relacionadas

con fenómenos volcánicos recientes y presentan frecuentemente gas carbónico en su composición, el cual le confiere ese paladar singular. Se emplean también como agua de mesa y se utilizan en afecciones gástricas, hepáticas y renales.

- *Aguas Ferruginosas*: Tienen alto contenido en hierro, fruto de la penetración de las aguas por terrenos que presentan vetas, filones o manchas de rocas ricas en este mineral. Están indicadas en casos de anemia, trastornos del crecimiento, obesidad y regímenes de adelgazamiento.

- *Aguas Radiactivas*: Son poco frecuentes. Proceden de zonas muy profundas en contacto con materiales geológicos muy antiguos, generalmente intrusivos. Los componentes de litio, cobalto, níquel, radio, etc, en cantidades muy pequeñas, están indicados en tratamientos para combatir el estrés, la ansiedad, la depresión y alteraciones nerviosas. También para artropatías reumáticas, afecciones musculares, afecciones ginecológicas no tuberculosas ni tumorales, dermatosis (eczemas, psoriasis). Favorecen la producción de hormonas de la corteza suprarrenal y las gónadas.

(Burbano., et al. 2013. p.10)

Las aguas minero-medicinales no se presentan casi nunca en estado puro, sino que se encuentran mezcladas, en distinta proporción de varios de estos grupos. Ello explica su acción polivalente ante diversos tipos de problemas de salud. Otro factor para entender la globalidad de los efectos beneficiosos sobre la salud es la climatología y el entorno que rodea al propio balneario. Los que están ubicados en zonas de montaña, tienen clima tónico y estimulante, indicado principalmente para afecciones respiratorias, pero no son recomendables para personas con patología cardíaca. Los de altitud media o baja (por debajo de los 400 metros sobre el nivel del mar) presentan un clima menos cambiante y más suave, apto en principio para cualquier persona o enfermedad. ((Burbano., et al. 2013. p.10)

Clasificación de las aguas termales de acuerdo a su pH

De acuerdo a su pH, las aguas termales se pueden clasificar en:

- *Acidas*: cuando el pH es menor a 6.8
- *Neutras*: cuando el pH está entre 6.8 a 7.2
- *Alcalinas*: cuando el pH es mayor a 7.2

(Burbano., et al. 2013. p.10)

Clasificación de las aguas termales por su origen geológico

Las aguas termales, por su origen geológico pueden ser clasificadas como magmáticas o telúricas.

- Las aguas magmáticas son primitivas. Surgen de una directa relación con filones metálicos o eruptivos. Sus temperaturas son elevadas, siempre mayores a 50°C y tienen un caudal periódico, rítmico y constante, siendo asimismo constantes su temperatura y composición.
- Por su parte las aguas telúricas, denominadas también aguas de “infiltración”, pueden surgir de cualquier terreno. Su caudal es variable, según los regímenes de lluvia y estaciones del año. Las temperaturas rara vez llegan a los 50°C. El grado de mineralización es de mediano a bajo y la concentración de minerales esta en inversa proporción con su caudal.

(Termared: http://www.termared.com/docs/repositorio/es_ES/investigacion/aguas-mineromedicinales.pdf)

1.2.3.2. Aguas Termominerales en el Ecuador

El Ecuador se encuentra localizado dentro del Circulo de Fuego del Pacifico, y debido a los movimientos de la placas internas de la tierra, permiten que las actividades magmáticas y los elevados flujos térmicos generados en la corteza terrestre se pongan en contacto con las aguas subterráneas que circulan a grandes profundidades; adquiriendo así un grado geotérmico alto que al llegar a la superficie se manifiestan como aguas calientes, ligadas especialmente a rocas volcánicas continentales y depósitos glaciares entre otros. (Paladines: www.geologiaecuador.com/2011/04/aguas-termales-minerales-y-naturales-de.html).

El científico Alemán Teodoro Wolf, en su obra capital “Geografía y Geología del Ecuador” publicada en 1.892, al referirse a las aguas termales y minerales del país decía: *“El Ecuador es muy rico en aguas termales y minerales, de toda clase, especialmente en las regiones andina e interandina; pero el uso que se hace de ellas es casi nulo. Es conocido cuantos progresos ha hecho en el mundo civilizado la Hidrología Medicinal, también podemos determinar cuán preciosos remedios poseemos en ciertas aguas minerales para el tratamiento de varias enfermedades. El Ecuador posee tales aguas en abundancia; pero sus médicos no las conocen, dejan su aplicación a la gente pobre e ignorante, y las tratan con el mismo desprecio como a los remedios naturales del País. Estos no se mencionan en las Farmacopeas de Europa, ERGO: no valen nada; nuestras aguas no se recomiendan como las de Vichy, Karlsbad, Selter, etc., en los periódicos; ERGO:*

vengan las extranjeras, cuesten lo que cuesten” (Paladines: www.geologiaecuador.com/2011/04/aguas-termo-minerales-y-naturales-de.html).

En el Ecuador, a las fuentes de aguas con características termo minerales se les atribuye propiedades curativas y relajantes, además se las relaciona con el misticismo y la leyenda; llegando en la actualidad a ser destinos turísticos y balneológicos.

1.2.3.4. Aguas Termominerales de Tungurahua.

La provincia de Tungurahua es una de las 24 provincias que conforman la República del Ecuador. Se encuentra al centro del país, en la región geográfica conocida como sierra. La ciudad de Ambato es su capital administrativa; se divide en 9 cantones; la provincia adquiere su nombre del estratovolcán activo homónimo, tiene una extensión de 3.335km² y se encuentra a 2.620 metros sobre el nivel del mar. (Burbano., et al. 2013. p.10)

Dentro de la provincia nos encontramos con varias fuentes termales entre las cuales tenemos:

Tabla 1-1: Aguas Termominerales de la provincia de Tungurahua

LOCALIDAD	H. TOPOGRAFICA	pH	T° (C)	TIPO
Cununyacu	Chimborazo	8.14	48	Hipertermal
Aguajan 1	Ambato	7.51	14.7	Fría
Aguajan 2	Ambato	8.38	20.8	Hipertermal
Salado	Baños	7.3	55	Hipertermal
La Virgen	Baños	7.49	52.8	Hipertermal
Las Peñas	Baños	7.16	50.7	Hipertermal
Santa Ana	Baños	7.31	44.8	Hipertermal

Fuente: Burbano., et al. 2013. p.10

1.2.3.5. Aguas Termominerales “LAS PEÑAS”

Baños de Agua Santa es una ciudad perteneciente a la provincia de Tungurahua, se encuentra situado en los flancos externos de la cordillera oriental de los Andes, en las faldas del volcán Tungurahua, a una altitud de 1820 msnm. Se encuentra a 40 km al este de Ambato, en la provincia

de Tungurahua, tiene una gran riqueza hidrológica, con algunos ríos en sus cercanías, como el río Bascún (al oeste), el río Ulba (al oriente de la ciudad) y principalmente, el río Pastaza que limita la ciudad al sur. (Albuja., 2010: p.45).

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

El volcán Tungurahua y el resto de elevaciones que rodean a la ciudad cubren a Baños de los fuertes vientos. Es una zona climática lluviosa tropical, su temperatura habitual es de unos 15 a 25 °C en verano. (Albuja., 2010: p.45).

El turismo del pueblo se relaciona íntimamente con el resto del cantón; el principal atractivo del cantón es la naturaleza, dotada de una alta biodiversidad. Posee 5 balnearios municipales con aguas minerales y sulfurosas que van desde las frías de 18 °C, hasta las termales de 55 °C; emergen de las entrañas del volcán Tungurahua. (Albuja., 2010: p.45).

El balneario “LAS PEÑAS” o Modernas es el más amplio de los balnearios pertenecientes a Baños; localizado a una altura de 1832 msnm, el agua que conforma una de las piscinas es mineral, bicarbonatada, ferruginosa, magnesiana, con una temperatura de 35 °C y la fría con 22 °C.; cuenta con toboganes. Se ubica al final de la calle Luis A Martínez, a 100 metros de la cascada “Cabellera de la Virgen”. (Municipio Baños: <http://www.municipiobanos.gob.ec/banos/index.php/es/>).

Figura 6-1: Balance Iónico Balneario “LAS PEÑAS”

ANION	mg/l	CATION	mg/l	OTRAS DETERMINACIONES	
CO3H-	2488,00	Na+	415,68	Parámetros	
CO3=	0,0	K+	71,36	pH	7,2
SO4=	1139,5	Ca++	60,30	CE (µs/cm)	5090
Cl-	402,00	Mg++	480,2	DUREZA (mg/l)	2126
NO3-	0,20	NH4+	0,248	TEMPERAT (°C)	50,70
NO2	0,050	Fe=	2,76		
PO4=	0,5				
OTRAS DETERMINACIONES					
Turbidez	56		Cobre	<0,25	
Color	136		Cromo	<1	
Alcalinidad	2488		Plomo	<1	
STD	3293,23		SiO2	590,1	
CO2	343,79		Mn	# REF	
OBSERVACIONES:					
TIPO DE AGUA					
BICARBONATADA MAGNESICA					
HIPERTERMAL					

Fuente: Burbano., et al. 2013. p.10

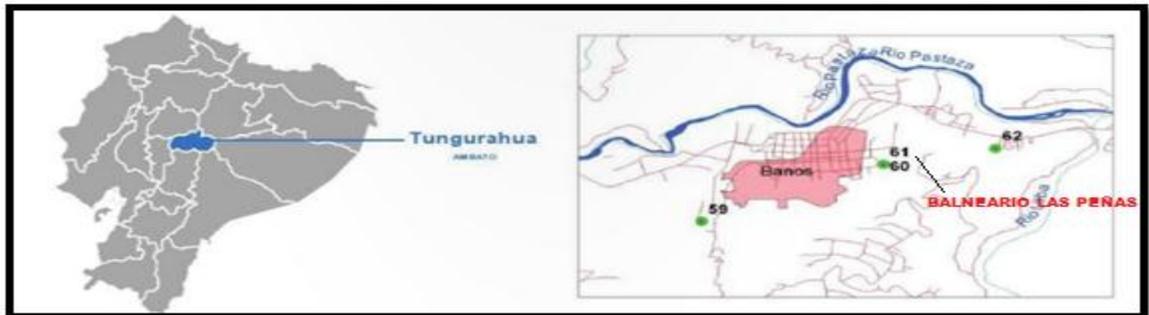
CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1. Características del lugar

2.1.1. *Localización:* El presente estudio se realizó en las Aguas Termales del Balneario Las Peñas, situado en los flancos externos de la cordillera oriental de los Andes, en las faldas del volcán Tungurahua, cantón baños, provincia Tungurahua, a una altitud de 1820msnm y una temperatura ambiente de 19°C. Es un manantial termal con una gran riqueza hidrológica, de tipo bicarbonatada magnésica, con algunos ríos en sus cercanías: río Bascún, río Ulba y río Pastaza. (Municipio Baños: <http://www.municipiobanos.gob.ec/banos/index.php/es/>).

Figura 1-2: Ubicación de las Aguas Termales del Balneario Las Peñas.



Fuente: Burbano., et al. 2013. p.85

Se ubican en la Provincia de Tungurahua, a 40Km al este de la ciudad de Ambato, delimitada por las coordenadas UTM descritas en la tabla 1-2.

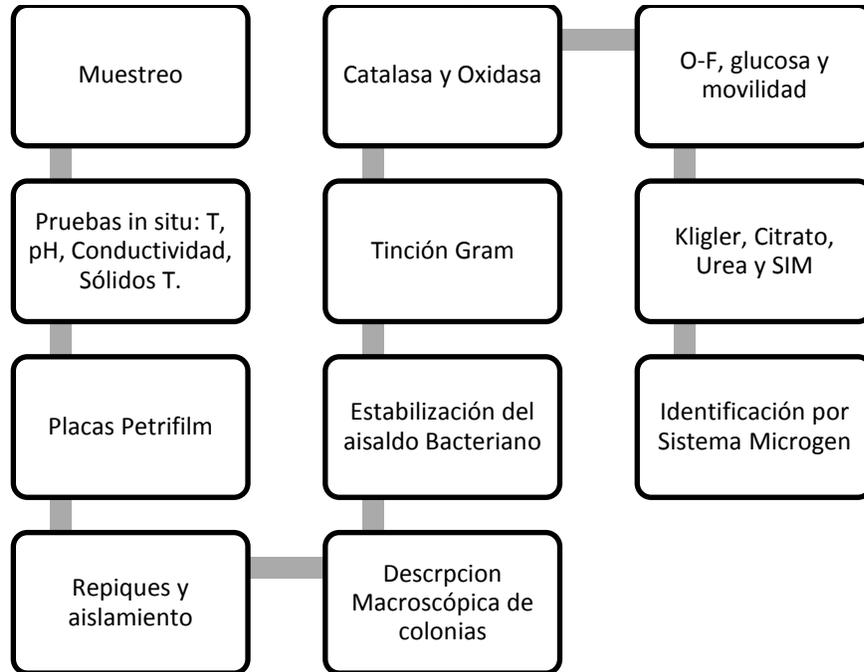
Tabla 1-2: Coordenadas UTM del Balnaerio Las Peñas.

Ubicación geográfica	Coordenadas UTM (m)
Este UTM	787400
Norte UTM	9845225
Altitud (msnm)	1832

Fuente: Burbano., et al. 2013. p.85

2.2. Diseño de la Investigación

Figura 2-2: Esquema del proceso a seguir para realizar el análisis microbiológico.



Realizado por: Pedro Cabrera, 2015

2.3. Unidad de Análisis

Mililitros de agua termal procedente del Balneario Las Peñas.

2.4. Población de Estudio

La unidad experimental y población de este estudio fueron las aguas termales del balneario Las Peñas, ubicadas en el cantón Baños, provincia de Tungurahua. En este lugar se realizaron muestreos de dos lugares, el primero del ojo de agua ubicado en la parte posterior del balneario y el segundo de la piscina de agua termal ubicada en el lado izquierdo de este complejo.

Figura 2-3: Sitios de muestro de las Aguas termales del balneario Las Peñas.



Realizado por: Pedro Cabrera, 2015

2.5. Metodología

2.5.1. Muestreo

Para realizar un correcto muestreo se tomó en cuenta todas las medidas de asepsia, es decir lavarse bien las manos y colocarse toda la ropa de protección, tomar la muestra en contracorriente, cerrar el frasco y sellarlo fuera del agua. Además de ello se siguió lo indicado por las normas NTE INEN 2176:2013 para muestreo y NTE INEN 2169:2013 para manejo y conservación de muestras.

2.5.2. Pruebas Físico- Químicas in situ (Temperatura, pH, Conductividad y Sólidos Totales).

Estas pruebas se realizaron in situ, es decir a pie de manantial y con las debidas normas de asepsia se introdujo el equipo multiparámetro de HANNA en el agua y se realizó el análisis correspondiente a los parámetros: pH, temperatura (°C), solidos totales (ppm) y conductividad (µs).

2.5.3. Análisis Microbiológico

2.5.3.1. Siembra en placas petrifilm

Placas Petrifilm para Conteo de Aerobios

- Se colocó la placa en una superficie plana y levantar el film superior.
- Se pipeteo 1mL de la muestra y colocarla en el centro del film inferior sin tocar el mismo con la punta de la pipeta.
- Se dejó caer el film superior para tapar la muestra.
- Se colocó el aplicador sobre la placa y presionarlo en el centro por unos segundos para distribuir el inóculo por toda la zona circular del petrifilm.
- Se esperó unos minutos a que solidifique el gel e incubar las placas a 30° C por 72 horas.
- Se realizó la lectura de las placas, usando luz directa. Las colonias rojas corresponden a aerobios.
- Se reportaron los resultados como UFC/mL (unidades formadoras de colonia por mililitro).

(3M™PETRIFILM™: http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat/workshopmrama/files/Petrifilm_guias.pdf)

Placas Petrifilm para E.coli/ Coliformes

- Se colocó la placa en una superficie plana y levantar el film superior.
- Se pipeteo 1mL de la muestra y colocarla en el centro del film inferior sin tocar el mismo con la punta de la pipeta.
- Se dejó caer el film superior para tapar la muestra.
- Se colocó el aplicador sobre la placa y presionarlo en el centro por unos segundos para distribuir el inóculo por toda la zona circular del petrifilm.
- Se esperó unos minutos a que solidifique el gel e incubar las placas a 35° C por 24 horas.
- Se realizó la lectura de las placas, usando luz directa. Las colonias rojas y azules corresponden a coliformes, mientras las azules asociadas a gas corresponden a *E. coli*.

- Se reportaron los resultados como UFC/mL (unidades formadoras de colonia por mililitro).

(3M™PETRIFILM™: http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat/workshopmrama/files/Petrifilm_guias.pdf)

Placas Petrifilm para Staphylococcus

- Se colocó la placa en una superficie plana y levantar el film superior.
- Se pipeteo 1mL de la muestra y colocarla en el centro del film inferior sin tocar el mismo con la punta de la pipeta.
- Se dejó caer el film superior para tapar la muestra.
- Se colocó el aplicador sobre la placa y presionarlo en el centro por unos segundos para distribuir el inóculo por toda la zona circular del petrifilm.
- Se esperó unos minutos a que solidifique el gel e incubar las placas a 37° C por 24 horas.
- Se realizó la lectura correspondiente, usando luz directa, si se observa únicamente colonias rojo violeta, corresponden a *S. aureus*.
- Se reportaron los resultados como UFC/mL (unidades formadoras de colonia por mililitro).

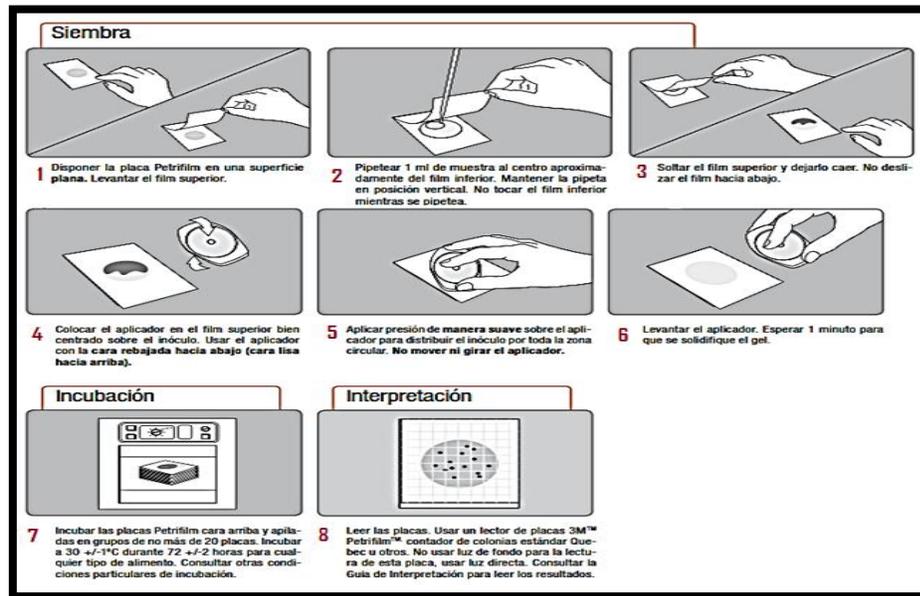
(3M™PETRIFILM™: http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat/workshopmrama/files/Petrifilm_guias.pdf)

Placas Petrifilm para Mohhos y Levaduras

- Se colocó la placa en una superficie plana y levantar el film superior.
- Se pipeteo 1mL de la muestra y colocarla en el centro del film inferior sin tocar el mismo con la punta de la pipeta.
- Se dejó caer el film superior para tapar la muestra.
- Se colocó el aplicador sobre la placa y presionarlo en el centro por unos segundos para distribuir el inóculo por toda la zona circular del petrifilm.
- Se esperó unos minutos a que solidifique el gel e incubar las placas a 25° C por 5- 7 días.
- Se realizó la lectura correspondiente, usando luz directa. Las colonias pequeñas con borde definidos y sin foco central corresponden a Levaduras, mientras que las colonias más grandes con bordes irregulares y con foco central corresponden a mohos.
- Se reportaron los resultados como UFC/mL (unidades formadoras de colonia por mililitro).

(3M™PETRIFILM™: http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat/workshopmrama/files/Petrifilm_guias.pdf)

Figura 2-4: Instrucciones de siembra para placas Petrifilm



Fuente:3M™:http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat/workshopmrama/files/Petrifilm_guies.pdf

2.5.3.2. Descripción Macroscópica de colonias

Después del periodo de incubación se observó las placas en contra luz.

- Se identificó la forma de las colonias (circular, puntiforme, irregular, etc.).
- Se observó: Bordes (entero, ondulado, filamentosos), superficie (lisa, rugosa, plegada), consistencia (cremosa, membranosa), color y luz reflejada en la superficie de la colonia (opaca, brillante).
- Se reportaron los resultados.

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

2.5.3.3. Estabilización del aislado bacteriano

- 1.- Se preparó Agar Mueller Hinton: medio de cultivo no selectivo que promueve el desarrollo microbiano.
 - Se suspendieron los gramos respectivos de polvo en la cantidad de agua purificada que se requiera, dependiendo la cantidad de placas a preparar.
 - Se calentó con agitación frecuente y hervir hasta que se disuelva totalmente.
 - Se enfrió y distribuyó en las placas Petri estériles, en volumen apropiado aproximadamente 4mm sobre una superficie horizontal.

2.- Se realizó tres repiques del microorganismo a aislar:

- Con un palillo estéril se tomó la muestra del material a estudiar y con un solo toque se colocó en la placa con el agar preparado.
- Se repitió ese proceso tres veces.

3.- Con el último repique realizado, se hizo una siembra por agotamiento.

- Incubar la placa en posición invertida a 37°C.

(Sánchez: <https://sites.google.com/a/goumh.umh.es/practicas-de-microbiologia>)

2.5.3.4. *Tinción Gram*

- 1.- Se colocó en el porta objetos una gota de solución salina.
- 2.- Con un palillo estéril se tomó una pequeña muestra de la cepa y diluirla.
- 3.- Con ayuda del mechero se fijó la muestra
- 4.- Se colocó cristal violeta esperar 1 minuto y enjuagar.
- 5.- Se colocó lugol esperar 1 minuto y enjuagar.
- 6.- Se colocó alcohol cetona esperar 30 segundos y enjuagar.
- 7.- Se colocó safranina esperar 1 minuto y enjuagar.
- 8.- Se secó la muestra y se observó en el microscopio a 100X.

(Vizcarrodo, & Gutiérrez., 2008. p.5).

Si al observar en el microscopio las bacterias desarrolladas en las placas petrifilm STX resultan ser cocos Gram Positivos, se confirma que los organismos corresponden a bacterias del genero *Staphylococcus*.

2.5.3.5. *Prueba de la Oxidasa*

- 1.- Usando una tirilla para oxidasa se tocó la colonia reactivada.
- 2.- Se observó el resultado: si la tirilla se tornó azul se considera positivo para oxidasa, si la tirilla no sufrió ningún cambio se considera oxidasa negativa.
- 3.- Repetir este proceso con cada una de las colonias puras reactivadas.

(Fernández., et al. 2010. p. 6)

2.5.3.6. *Producción de catalasa*

- 1.- Se emulsionó una colonia en un portaobjeto con una gota de agua oxigenada de 10 volúmenes.

2.- Se observó si existe desprendimiento de burbujas, lo que corresponde a una prueba positiva.

(Fernández., et al. 2010. p. 6)

2.5.3.7. *Oxidación- fermentación de la glucosa*

1.- Se preparó medio Hugh y Leifson el cual es usado para determinar el metabolismo oxidativo fermentativo de las bacterias Gram negativas:

- Para 1L de medio: se disolvieron 2g de triptona, 5g de cloruro sódico y 0,3g de fosfato dipotásico en 1L de agua destilada.
- Se ajustó a pH 7,1.
- Se añadió 15 mL de azul de bromotimol al 2% y 3g de Agar, calentando hasta ebullición.
- Se distribuyó en cantidades de 100mL y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos.
- Se atemperó a 45- 50°C y añadió asepticamente a 100mL de medio estéril, 10mL de una solución de glucosa al 10% esterilizada por filtración, mezclando a fondo.
- Se dispensó asepticamente 5mL en tubos estériles, manteniéndolos en posición vertical.
- Se realizó la prueba por duplicado.

2.- Con ayuda de la aguja, se sembró cada colonia reactivada en dos tubos del medio preparado.

3.- A uno de los tubos, luego de sembrada la bacteria, se recubrió con vaselina estéril.

4.- Se incubó a 30°C durante 72 horas.

5.- Se observó los resultados: tanto la producción de ácido a partir de glucosa por vía fermentativa (tubo con vaselina) como la producción de ácido a partir de glucosa por vía oxidativa (tubo sin vaselina) se observan por un cambio de color del indicador de violeta a amarillo.

(Barrow, & Feltham., 1993. p. 198)

2.5.3.8. *Observación de la movilidad*

1.- Se preparó agar movilidad: medio usado para determinar la movilidad de un bacilo Gram negativo

- Para 1L de agar: se disolvieron 3g de extracto de carne, 10g de peptona, 5g de cloruro sódico y 4g de agar en 1L de agua destilada.
- Se ajustó el pH a 7,3.
- Se distribuyó en tubos en cantidades de 5mL.
- Se esterilizó a 121°C durante 15 minutos y dejar solidificar en posición vertical.
- Se sembró por picadura cada una las colonias reactivadas en el agar preparado.

- Se observó si el crecimiento sobrepasa la línea sembrada, lo que indica que la bacteria tiene movilidad.

Si las bacterias Gram negativas inoculadas tanto en medio O/F, como en agar movilidad dan resultados positivos junto con la prueba de oxidasa, se consideran bacterias *E. coli*. (Barrow, & Feltham., 1993. p. 198)

2.5.3.9. Pruebas Bioquímicas: Kligler, SIM, Urea y Citrato

Estas pruebas se realizaron para todas las bacterias Gram Negativas y oxidasa positivas:

Agar Hierro Kligler

- 1.- Se suspendieron los gramos respectivos de polvo en la cantidad de agua purificada que se requirió (54.8g en 1L de agua destilada), dependiendo la cantidad tubos que se necesite.
- 2.- Se calentó con agitación frecuente y se hirvió hasta que se disolvió totalmente.
- 3.- Se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos.
- 4.- Se distribuyó en tubos estériles, a razón de 4-5mL, en forma de pico de flauta, se taparon los tubos con corchos también estériles.
- 5.- Se calentó al rojo vivo la aguja de inoculación, se la enfrió y se tocó la colonia que se deseaba sembrar en el tubo.
- 6.- Se destapó el tubo, colocando la tapa entre el dedo meñique y anular. Se flameó la boca del tubo.
- 7.- Se sembró por picadura la colonia aislada. Se retiró la aguja siguiendo el camino de entrada.
- 8.- Sin volver a recargar el asa, se sembró en estría la superficie del pico de flauta.
- 9.- Se calentó la aguja al rojo vivo después de la inoculación.
- 10.- Se incubó a 30-35°C durante 18-24 horas.
- 11.- Se observaron los resultados:
 - Producción de ácido a partir de glucosa: en la parte inferior del medio hay un cambio de color debido al indicador de pH que pasa de rojo a amarillo.
 - Producción de gas glucosa (CO₂ y H₂): se aprecian por la aparición de burbujas en la parte inferior del tubo, producción de grietas o incluso la elevación del medio.
 - Producción de lactosa: se aprecia por un cambio de color en el pico que pasa de rojo a amarillo.
 - Producción de sulfhídrico: se aprecia por un ennegrecimiento del medio en la línea de inoculación o sobre la capa superficial, en algunos casos llega a ennegrecerse todo el medio.

(Álvarez, & Boquet., 1990. p. 140).

Cuadro 1-2: Interpretación de resultados para la prueba de Kligler

Resultados	Lactosa	Glucosa	Interpretación
Cultivo amarillo	+	+	Ácida/ácida
Fondo amarillo y pico rosa	-	+	Alcalino/ácido
Cultivo rosa	-	-	Alcalino/alcalino
Precipitado negro			Producción de SH ₂
Ruptura o desplazamiento del medio			Produccion de gas

Fuente: Bejar, .. et al. 2015. p.56

Medio SIM (Sulfuro- Indol- Movilidad)

- 1.- Se suspendieron los gramos respectivos de polvo en la cantidad de agua purificada que se requirió (30g en 1L de agua destilada), dependiendo la cantidad de tubos que se necesite.
- 2.- Se calentó con agitación frecuente y se hirvió hasta que se disolvió totalmente.
- 3.- Se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos.
- 4.- Se distribuyó en tubos estériles, a razón de 4-5mL, en forma vertical, se taparon los tubos con corchos también estériles.
- 5.- Se calentó al rojo vivo la aguja de inoculación, se la enfrió y se tocó la colonia que se deseaba sembrar en el tubo.
- 6.- Se destapó el tubo, colocando la tapa entre el dedo meñique y anular. Se flameó la boca del tubo.
- 7.- Se sembró por picadura la colonia aislada. Se retiró la aguja siguiendo el camino de entrada. Se flameó la boca del tubo.
- 8.- Se calentó la aguja al rojo vivo después de la inoculación.
- 9.- Se incubó a 30-35°C durante 18-24 horas.
- 10.- Se observaron los resultados:
 - Motilidad: se produce una turbidez en el medio, esta debe extenderse más allá de la línea de siembra.
 - Producción de SH₂: se observa un ennegrecimiento a lo largo de la línea de siembra o en todo el medio.
 - Indol: pasadas las 24h se coloca sobre el medio, cinco gotas del reactivo de Kovac, la aparición de un anillo rojo se considera una prueba positiva.

(Álvarez, & Boquet., 1990. p. 140).

Agar Base Urea (Medio de Christensen)

- 1.- Se suspendieron los gramos respectivos de medio en la cantidad de agua purificada que se requiera (24g en 1L de agua destilada), dependiendo la cantidad de tubos que se necesiten.
- 2.- Se calentó con agitación frecuente y se hirvió hasta que se disolvió totalmente.
- 3.- Se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos.
- 4.- Se añadió una solución estéril de urea (100mL para 1L de medio). Esta solución se realizó al 20%, es decir se pesaron 20g de urea deshidratada y se disolvieron en 100mL de agua destilada. Se esterilizó por filtración, puesto que el calor desnaturaliza la urea.
- 5.- Se distribuyó en tubos estériles, en forma de pico de flauta, se taparon los tubos con corchos también estériles.
- 6.- Se calentó al rojo vivo la aguja de inoculación, se la enfrió y se tocó la colonia que se desea sembrar en el tubo.
- 7.- Se destapó el tubo, colocando la tapa entre el dedo meñique y anular. Se flameó la boca del tubo.
- 8.- Se sembró por picadura la colonia aislada. Se retiró la aguja siguiendo el camino de entrada.
- 9.- Sin volver a recargar el asa, se sembró en estría la superficie del pico de flauta.
- 10.- Se calentó la aguja al rojo vivo después de la inoculación.
- 11.- Se incubó a 30-35°C durante 18-24 horas.
- 12.- Se observaron los resultados: positivo si el medio se torna de un tono rosado, y negativa si mantiene su color original.

(Álvarez, & Boquet., 1990. p. 142).

Agar Simmons Citrato

- 1.- Se suspendieron los gramos respectivos de medio en la cantidad de agua purificada que se requiera (24,2g en 1L de agua destilada), dependiendo la cantidad de tubos que se necesiten.
- 2.- Se calentó con agitación frecuente y se hirvió hasta que se disuelva totalmente.
- 3.- Se distribuyó en tubos a razón de 4-5mL.
- 4.- Se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos y dejó enfriar en posición inclinada (pico de flauta).
- 5.- Se calentó al rojo vivo la aguja, se la enfrió y se tocó la colonia que se desea sembrar en el tubo.
- 6.- Se destapó el tubo, colocando la tapa entre el dedo meñique y anular. Flamear la boca del tubo.
- 7.- Se sembró por picadura la colonia aislada. Se retiró la aguja siguiendo el camino de entrada.
- 8.- Sin volver a recargar el asa, se sembró en estría la superficie del pico de flauta.
- 9.- Se calentó la aguja al rojo vivo después de la inoculación.
- 10.- Se incubó a 30-35°C durante 18-24 horas.

11.- Se observaron los resultados: la positividad de la prueba se confirma si se observa crecimiento sobre el pico de flauta o si existe una variación de color de verde a azul, debido a la alcalinización del medio, ocasionado por la liberación de sodio del citrato utilizado.

(Álvarez, & Boquet., 1990. p. 142).

2.5.3.10. Identificación bacteriana

Luego de realizadas todas las pruebas descritas hasta este momento, los resultados se compararon con los cuadros de características diferenciales para las especies de las familias bacterianas más comunes, como el que se muestra en la imagen 2-5.

Figura 2-5: Características bioquímicas para la diferenciación de especies bacterianas de la familia *Enterobacteriaceae*.

	KLIGLER				Citrato	Fenilalanina desaminasa	Indol	Lisina decarboxilasa	Manitol	Movilidad	Ureasa
	140 Glucosa	Gas/glucosa	260 Lactosa	100 SH ₂							
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	-	-	-	+	+	+	V ⁺	-
<i>Escherichia coli</i> inactivo	+	-	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> (1)	+	V	V ⁻	-	V ⁻	-	-	V	+	-	V ⁻
<i>Klebsiella rhinoscleromatis</i> (1).	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
<i>Enterobacter cloacae</i>	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	V ⁺
<i>Enterobacter aerogenes</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 liquefaciens</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, María., & BOQUET, Ernesto. 1990. p. 74

Si posterior a la revisión de resultados y tablas de comparación, se encontraron coincidencias con las bacterias descritas, se reportan los nombres de los microorganismos. De lo contrario para obtener un resultado se acude a sistemas de pruebas bioquímicas estandarizadas.

2.5.3.11. *Identificación de bacterias mediante el Sistema de Identificación Bioquímica Microgen™*

- 1.- Se inoculó cada colonia bacteriana en 3-5 mL de solución salina al 0.85% .
- 2.- Se colocó de 3-4 gotas (100µL) de la solución en cada pocillo.
- 3.- Se colocó de 3-4 gotas de aceite mineral en los pocillos que así lo requirieron, es decir donde la guía rápida del producto indicaba.
- 4.- Se incubó de 24-48 horas a una temperatura de 35-37°C.
- 5.- Se realizó una lectura inicial de cada pocillo.
- 6.- Se adicionó los reactivos necesarios en los pocillos que así lo ameritaban, es decir donde la guía rápida del producto indicaba.
- 7.- Se realizó la lectura final de resultados, guiándose en la tabla de colores indicada en la guía rápida del producto.

Figura 2-6: Tabla de colores Microgen™ GnA+B-ID System

Microgen™ GN A ID													
WELL/NAPFCHEN /GODET	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	7
Reaction	Lysine	Ornithine	H ₂ S	Glucose	Mannitol	Xylose	O.N.P.G.	Indole	Urease	V.P.	Citrate	T.D.A.	Nitrate
Negative													
Positive													

Microgen™ GN B ID													
WELL/NAPFCHEN /GODET	13								Adonitol	Raffinose	Salicin	Arginine 24hrs	Arginine 48hrs
Negative													
Positive													

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

- 8.- Se llenó la hoja de resultados de Microgen, según los valores descritos en la misma, con lo que se obtuvo un valor numérico de 9 dígitos

Figura 2-7: Ejemplo de la hoja de resultados de Microgen

MICROGEN GN-ID A+B PANEL													MICROGEN BIOPRODUCTS														
REPORT FORM																											
Lab. No. 3341				Specimen Type: CHEESE SANDWICH																							
				Date: 28TH JANUARY 2002																							
Well Number				GN A wells												GN B wells											
Reaction	Oxidase	Motility	Nitrate	Lysine	Ornithine	H ₂ S	Glucose	Mannitol	Xylose	ONPG	Indole	Urease	V.P.	Citrate	TDA	Gelatin	Malonate	Inositol	Sorbitol	Rhamnose	Sucrose	Lactose	Arabinose	Adonitol	Raffinose	Salicin	Arginine
Result				++	-		++	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	++	+	-	-	-	-	-
Reaction Index	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1
Sum of Positive Reactions				6			7			6			0			0			7			6			0		
Profile No: 67600760				Final Identification: E. coli																							
WF6125/01/12																											

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

9.- Se introdujo el perfil numérico en el Software Microgen Identification System, el cual generó un informe de los cinco microorganismos más parecidos en una base de datos selectiva.

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

CAPÍTULO III

3. MARCO DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Pruebas Físico- Químicas In Situ

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

PARÁMETRO	VALOR		PROMEDIO
	Ojo de Agua	Piscina	
Temperatura (°C)	52.2	47.4	49.8
pH	7.6	7.7	7.65
Sólidos totales (ppm)	3000	3000	3000
Conductividad (µs/cm)	4999	4999	1784
T° ambiente	19°C		

Realizado por: Pedro Cabrera, 2015

Los datos descritos en la tabla 1-3 muestran los resultados del análisis físico- químico realizado “ in situ” al manantial termal del balneario Las Peñas. Como se muestra la temperatura promedio de estas aguas es 49.8°C, mientras que la temperatura ambiente del lugar es 19°C, cumpliendo así con lo descrito por Burbano, quien indica que la temperatura de un afluyente de agua para ser considerado termal debe estar por encima de 4- 5°C de la media anual del ambiente en el que se encuentran. (Burbano., et al. 2013. p.10).

Así mismo este parámetro indica que estas aguas constituyen un manantial hipertermal, puesto que su elevada temperatura se encuentra en el rango de este tipo de aguas, más de 40°C. (Burbano., et al. 2013. p.10).

En cuanto al pH se determinó que este manantial es ligeramente básico con un valor de 7.65, dato muy parecido al análisis realizado por el INAMHI en 2013, donde se reporta un pH 7.2 para estas aguas. (Burbano., et al. 2013. p.86).

Según lo descrito por Flores, el pH del agua depende mucho de su composición química, siendo así que manantiales constituidos en su mayoría por bicarbonatos como es el caso de este afluyente o el de Tirada ubicado en España tienden a elevar su pH por encima de 7. (Flores., 2013. p. 73).

Cabe recalcar que ambos parámetros afectan enormemente al desarrollo de los microorganismos, por lo que Núñez en su investigación indica que el crecimiento microbiano es proporcional a la temperatura, es decir a temperaturas mínimas se inhibe, y mientras la temperatura aumenta, el crecimiento también lo hace hasta encontrar su clima óptimo de desarrollo. Tomando en cuenta también que a temperaturas demasiado elevadas se puede provocar la muerte celular. (Núñez., et al. 2004. p.56).

Por su parte el pH como indica Mandigan, es específico para cada especie, es decir cada tipo de microorganismo tiene un pH óptimo para crecer y desarrollarse, aunque la mayoría de bacterias tienden a crecer en un pH de 5.5-8. (Mandigan., et al. 1998. p.165).

Por lo tanto se puede decir que la temperatura de este manantial 49.8 °C permitirá el crecimiento de bacterias que de cierto modo resistan temperaturas elevadas, pero a la vez puede ser variado debido a que posee el pH óptimo para a mayoría de bacterias 7.65, datos que se corroboraran con los análisis posteriores.

3.2. Análisis Microbiológico

En la tablas que se muestran a continuación se podrá observar claramente cada uno de los estudios microbiológicos realizados en el manantial termal de Las Peñas, donde hubo un crecimiento bacteriano tanto en el ojo de agua como en la piscina, siendo esta ultima la que mayor crecimiento reporta.

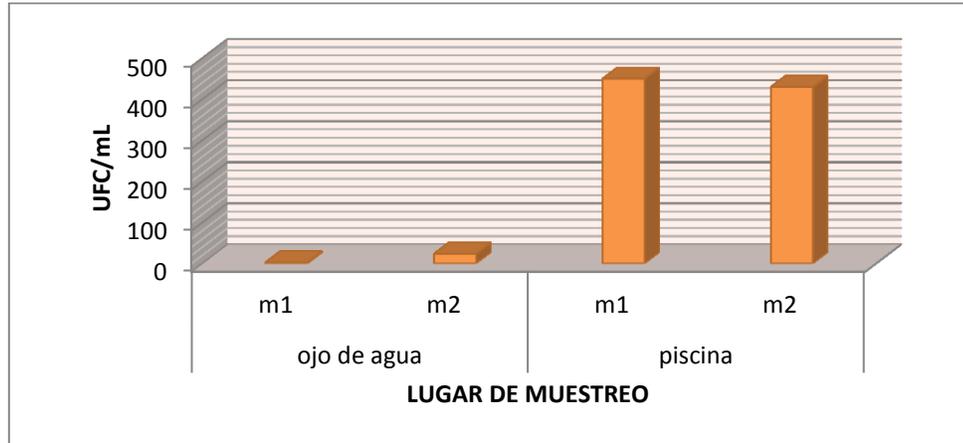
3.2.1. Análisis de Bacterias Aerobias Mesófilas

Tabla 2-3: Recuento de Bacterias *Aerobias Mesófilas* de las aguas termales del balneario Las Peñas.

LUGAR DE MUESTREO		UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC/mL)	MEDIA (UFC/mL)	DESVIACION ESTÁNDAR	VARIANZA
OJO DE AGUA	M ₁	3	13.5	14.8492	220.5
	M ₂	24			
PISCINA	M ₁	450	440	14.1421	200
	M ₂	430			
TOTAL		9.07X10²	226.75	301.581	90951.12

Realizado por: Pedro Cabrera, 2015

Gráfica 1-3: Recuento de Bacterias Aerobias Mesófilas de las aguas termales del balneario Las Peñas



Realizado por: Pedro Cabrera, 2015

La tabla 2-3 muestra que existe crecimiento bacteriano tanto en el ojo de agua 14 UFC/mL como en la piscina 4.40×10^2 UFC/mL, siendo esta última el lugar donde existe mayor proliferación de organismos mesófilos, esto probablemente debido a que el ojo de agua no cuenta con la protección necesaria y la piscina en cambio está más expuesta al ambiente y sus agentes contaminantes.

Apella & Araujo en su estudio a las aguas termales explican que la cantidad de bacterias *Aerobias Mesófilas* determinan la efectividad de su tratamiento. (Apella & Araujo: www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02_Capitulo_02.pdf).

Otro criterio según Andueza, menciona que la presencia de bacterias Aerobias mesófilas en numerosas cantidades demuestra problemas de higiene y contaminación del agua. (ANDUEZA., 2014. p.19).

Según la Norma de Calidad Ambiental y de Descarga de Efluentes: Recurso Agua, estas bacterias son Indicadoras de Contaminación ya que desde el punto de vista sanitario las condiciones bacteriológicas del agua son fundamentales y de acuerdo con la Norma Bacteriológica de Calidad establece que el agua debe estar exenta de patógenos de origen entérico y parasitario intestinal que son los responsables de transmitir enfermedades como salmonelosis, shigelosis, amebiasis, etc.

Estudios realizados en el balneario El Raposo en España citan un número de bacterias de 178 UFC/mL (De La Rosa., 2013, p.70), mucho menor al encontrado en nuestro balneario, al igual que en estudios realizados (Flores., 2013, p.48) en los manantiales termales La Mitisús y Santa Apolonia del estado de Mérida donde reporta un crecimiento de >16 UFC/mL.

Lo que nos indica que lo más probable es que en el balneario no se usen los equipos de desinfección y limpieza de manera adecuada e incluso pueda que existan fallas en las medidas de bioseguridad y asepsia por parte de los encargados de la limpieza y cuidado tanto de la piscina como del ojo de agua.

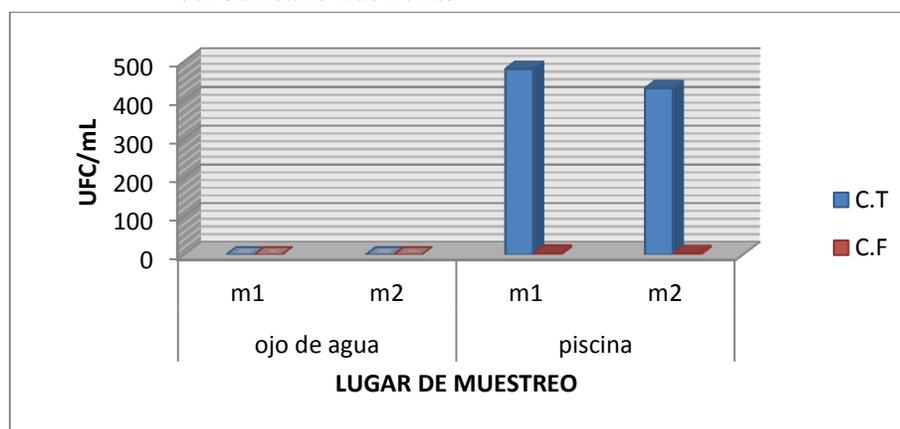
3.2.2. Recuento de Coliformes Totales y Fecales

Tabla 3-3: Recuento de Bacterias Coliformes Totales y Fecales de las aguas termales del balneario Las Peñas.

LUGAR DE MUESTREO		UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC/mL)			MEDIA (UFC/mL)	DESVIACION ESTÁNDAR	VARIANZA
		COL.T	COL. F	TOTAL			
OJO DE AGUA	M ₁	0	0	0	0	0	0
	M ₂	0	0	0			
PISCINA	M ₁	480	5	485	459.5	36.0624	1300.5
	M ₂	430	4	434			
TOTAL		9.10X10²	9	924	229.75	324.9155	105570.1

Realizado por: Pedro Cabrera, 2015

Gráfico 2-3: Recuento de Bacterias Coliformes Totales y Fecales de las aguas termales del balneario Las Peñas



Realizado por: Pedro Cabrera, 2015

Como se muestra en la tabla 3-3 el ojo de agua de este balneario está libre de este tipo de bacterias, pero en cambio la piscina muestra un crecimiento algo elevado de las mismas 9.10×10^2 UFC/mL, es decir en este lugar es donde radica el problema de inocuidad.

La División de Salud Pública de Carolina del Norte explica que la presencia de bacterias coliformes totales es normal en el suelo y plantas, y que generalmente no causan ningún daño a la

salud, pero en cambio las coliformes fecales como la *E. coli*, solo se encuentran en los intestino de los animales y humanos y por lo tanto su presencia en las aguas indica contaminación de origen fecal. (NCPH: http://epi.publichealth.nc.gov/oeo/docs/Las_Bacterias_Coliformes_WellWaterFactSt.pdf).

Alzamora, por su parte menciona que las bacterias Coliformes totales y fecales son indicadores de contaminación fecal en el control de calidad del agua destinada al consumo humano debido a que los coliformes son más resistentes que las bacterias patógenas intestinales. (Alzamora., 2014. p. 28).

De igual manera otro criterio según Andueza, aduce que la ausencia de este grupo de microorganismos Coliformes totales y fecales es indicativo que el agua presenta adecuadas condiciones de higiene y que se descarta la posibilidad de que el agua esté contaminada con patógenos, como *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus*. (Andueza., 2014. p.19).

La Legislación española (BOE número 226 del 20 de Septiembre de 1990, relativa a la reglamentación técnico sanitaria para el abastecimiento y control de calidad de las aguas potables de consumo público), donde menciona: “La fuente de agua termal es de utilidad pública y como tal debe cumplir las condiciones de portabilidad de agua”.

Estudios realizados en el Balneario El Raposo por M. Carmen de la Rosa Jorge, han detectado Coliformes totales en número bajo, menor de 10 por 100 mL. Las especies identificadas proceden del suelo y no indican contaminación fecal. (De La Rosa., 2013, p.71)

Según lo descrito anteriormente la presencia de 9.10×10^2 UFC/mL correspondientes a bacterias Coliformes totales no se considera un problema real, puesto que lo más probable es que las mismas provengan simplemente del suelo y plantas que rodean las piscinas del balneario. El inconveniente radica en la presencia de 9.0 UFC/mL correspondientes a bacterias Coliformes Fecales (*E. coli*), ya que lo ideal para aguas de uso humano es una ausencia total de este tipo de microorganismos, lo más probable es que su presencia en este lugar se deba a que la tubería que conduce el agua desde el ojo hasta la piscina se encuentra averiada en uno de sus tramos, lugar que queda de cierta manera expuesto al ambiente que lo rodea, donde varios animales del lugar provocan la contaminación en este sitio, manifestando así la necesidad urgente de una reparación que devuelva la calidad e inocuidad al balneario.

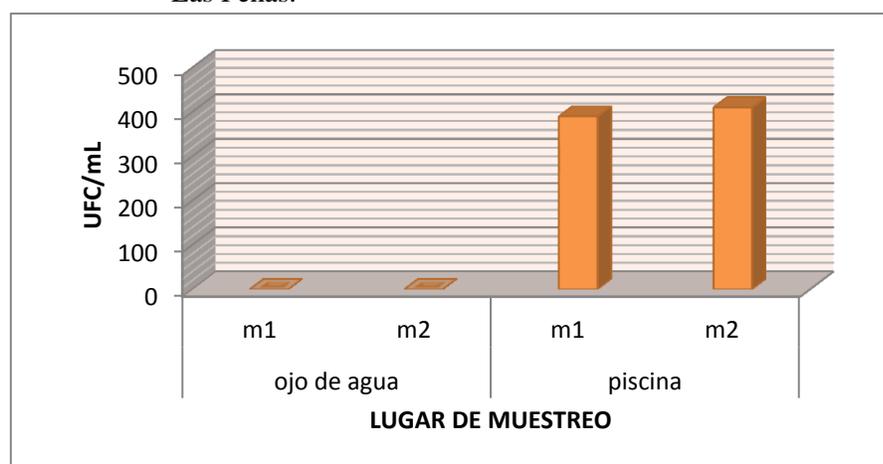
3.2.3. Análisis de *Staphylococcus*

Tabla 4-3: Recuento de *Staphylococcus* presentes en las aguas termales del balneario Las Peñas.

LUGAR DE MUESTREO		UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC/mL)	MEDIA (UFC/mL)	DESVIACION ESTÁNDAR	VARIANZA
OJO DE AGUA	M ₁	0	0	0	0
	M ₂	0			
PISCINA	M ₁	390	400	14.1421	200
	M ₂	410			
TOTAL		8.00X10 ²	200	282.8427	80000

Realizado por: Pedro Cabrera, 2015

Gráfico 3-3: Recuento de *Staphylococcus* presentes en las aguas termales del balneario Las Peñas.



Realizado por: Pedro Cabrera, 2015

A pesar de que el *Staphylococcus aureus* se encuentra ampliamente distribuido en el ambiente y forma parte de la gran diversidad de los microorganismos autóctonos de las aguas minerales de balnearios termales. (MOSSO, et al. 1994. p.45), este balneario no presenta bacterias de este tipo, el crecimiento de 8.00 X10² UFC/mL descrito en la tabla 4-3 no se trata de *Staphylococcus*, sino de otro tipo de bacteria que de alguna u otra manera encontró en las placas petrifilm de este tipo un ambiente adecuado para desarrollarse. Demostrando así que en este análisis no se encontraron bacterias de este género en las aguas del balneario Las Peñas.

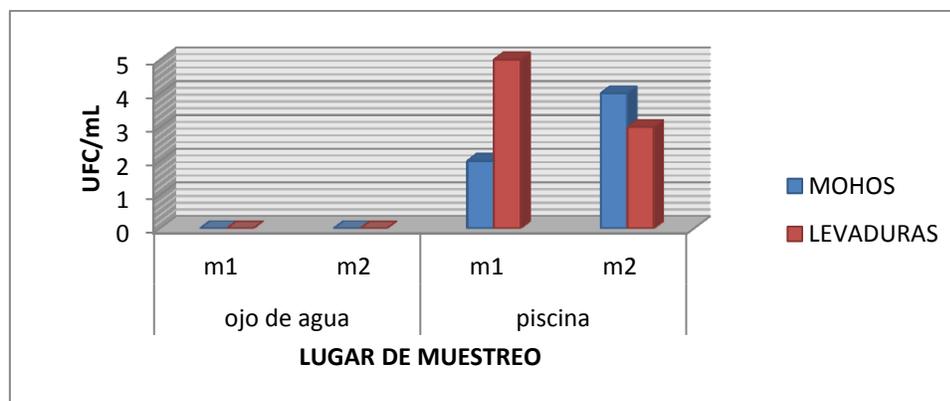
3.2.4. Análisis de Mohos y Levaduras

Tabla 5-3: Recuento de Mohos y Levaduras presentes en las aguas termales del balneario Las Peñas.

LUGAR DE MUESTREO		UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC/mL)			MEDIA (UFC/mL)	DESVIACION ESTÁNDAR	VARIANZA
		MOHOS	LEV.	TOTAL			
OJO DE AGUA	M ₁	0	0	0	0	0	0
	M ₂	0	0	0			
PISCINA	M ₁	2	5	7	7	1.4142	2
	M ₂	4	3	7			
TOTAL		6.0	8.0	14	3.5	2.1213	4.5

Realizado por: Pedro Cabrera, 2015

Gráfico 4-3: Recuento de Mohos y Levaduras presentes en las aguas termales del balneario Las Peñas.



Realizado por: Pedro Cabrera, 2015

Como se muestra en la tabla 5-3 existe un crecimiento de 6.0 UFC/mL de mohos y 8 UFC/mL de levaduras.

Doadrio en su estudio al balneario el Raposo indica que aunque la presencia de estos microorganismos no es común en aguas termales, se han encontrado en varios manantiales, ya que la mayoría proviene del suelo, pero se adaptan a las condiciones de estos ambientes acuáticos. (DOADRIO., 2013. p.73).

De la Rosa Jorge, también menciona que un resultado mínimo indica que este microorganismo puede provenir de otros hábitats (suelo, vegetales) cercano a las aguas termales y que se adaptó a estas condiciones adversas. (De La Rosa, & Mosso., 2000. p.155).

Según Vera García tanto mohos y levaduras crecen en condiciones aerobias, se desarrollan mejor en ambientes ácidos de pH 3.8 a 5.6, y hasta pueden tolerar pH de 2 a 8, pueden crecer en condiciones de temperaturas de 0 hasta 50°C, sin embargo la mayoría de especies tienen temperaturas óptimas de crecimiento de entre 22 y 30°C. (García., 2000 :p.113).

Por lo tanto se puede considerar que la presencia de mohos y levaduras en estas aguas es consecuencia de alguna contaminación proveniente del suelo y de plantas que rodean el lugar.

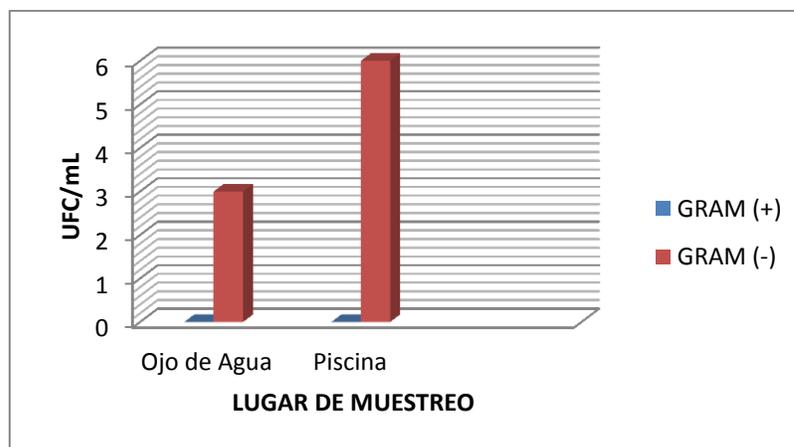
3.2.5. Bacterias Gram Positivas y Gram Negativa

Tabla 6-3: Recuento de bacterias Gram Positivas y Gram negativas de las aguas termales del Balneario Las Peñas.

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

Realizado por: Pedro Cabrera, 2015

Gráfico 5-3: Recuento de bacterias Gram Positivas y Gram negativas de las aguas termales del Balneario Las Peñas.



Realizado por: Pedro Cabrera, 2015

Según los resultados indicados en la tabla 6-3, en estas aguas existe un total predominio de bacterias Gram negativas, puesto que los resultados de este análisis dieron un 100% de bacilos de este tipo.

MOSSO en su estudio a manantiales termales indica: “En las mesotermas predominan los bacilos Gram negativos y los cocos Gram positivos. Mientras que en las aguas termominerales las Gram (+) son mayormente registradas, los principales géneros identificados han sido: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Enterobacter*, *Acinetobacter* y *Arthrobacter*. Los bacilos Gram positivos irregulares como *Arthrobacter*, *Kurthia*, *Corynebacterium*, *Cellulomonas*, *Exiguobacterium*, *Rubrobacter* se localizan generalmente en aguas hipertermales o carbónicas” (Mosso., et al. 1999. p.439).

Por su parte Flores en su investigación a los manantiales termales de la localidad de Mitisus y Santa Apolonia en Mérida, Venezuela, las dos de tipo hipertermal, muestran que al igual que en las aguas de este balneario existe un predominio de cepas Gram (-) con un 88.33%, a diferencia de un 16.66% de cepas Gram positivas. (Flores., 2013, p.51).

En estudios realizados en manantiales mineromedicinales del Balneario de Alicún de las Torres (Granada) también se encontraron en mayor cantidad Bacilos Gram negativos en un porcentaje de 54,5% y en menor cantidad bacilos Gram positivos con 29,10% y cocos Gram negativos 16,4%. (Flores., 2013, p.51).

Así mismo en otras investigaciones realizadas por Jorge De La Rosa y sus colaboradores en el Balneario Puente Viesgo cita que las bacterias aisladas corresponden en un porcentaje mayoritario a bacilos Gram negativos (43.2%) y en menor proporción a bacilos y cocos Gram positivos (18.9%). (De la rosa., et al. 2007, p.251).

Datos que casi coinciden en su totalidad con lo reportado en los análisis hechos al balneario Las Peñas, donde el 100% de las cepas aisladas corresponden a bacilos Gram negativos y ninguna bacteria Gram positiva, esto debido a que los microorganismos presentan características cambiantes y las aguas de Ecuador aún son un misterio para los analistas.

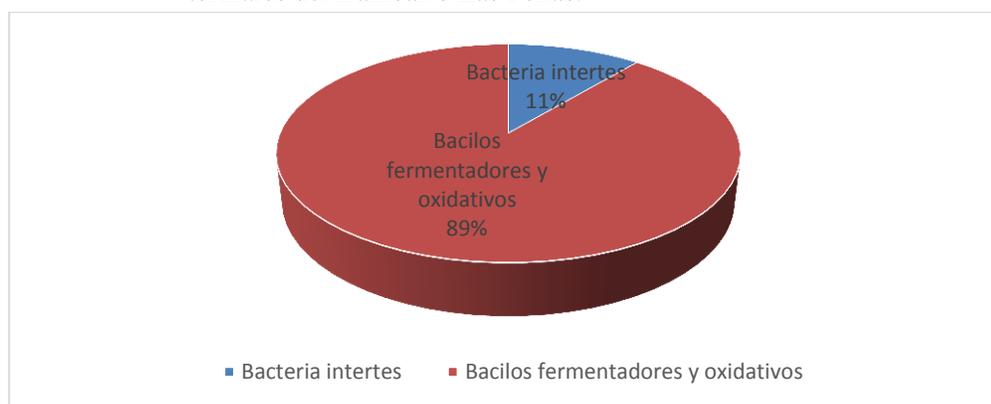
3.2.6. Bacterias Fermentadoras, Oxidativas e Inertes

Tabla 7-3: Recuento de bacterias Fermentadoras, Oxidativas e Inertes de las aguas termales del Balneario Las Peñas.

SITIO DE MUESTREO	B. FERMENTADORAS Y OXIDATIVAS	B. INERTES	TOTAL
Ojo de Agua	2	1	3
Piscina	6	0	6
PORCENTAJE %	89	11	100

Realizado por: Pedro Cabrera, 2015

Gráfico 6-3: Porcentaje de bacterias Fermentadoras, Oxidativas e Inertes de las aguas termales del Balneario Las Peñas.



Realizado por: Pedro Cabrera, 2015

El medio OF (oxido fermentativo) se usa comúnmente para establecer si los bacilos Gram negativos hallados en la investigación utilizan los hidratos de carbono por vía fermentativa u oxidativa, o si no los utilizan. Siendo así Rodríguez indica que las bacterias pueden ser fermentativas como las anaerobias, las facultativas pueden fermentar en ausencia de oxígeno u otro aceptor de electrones, o degradar carbohidratos oxidativamente, mientras que las aerobias estrictas pueden degradar carbohidratos únicamente mediante metabolismo oxidativo en presencia de aceptores inorgánicos de electrones. (Rodríguez., et al. 2005 p. 58).

Los datos expuestos en la tabla 6-3 indican q tan solo un 11% corresponde a bacterias inertes, mientras que un 89% corresponde a bacilos fermentadores y oxidativos, según la Universidad Nacional del Rosario estos últimos generalmente corresponden a *Enterobacterias*, *Vibrios* y *Aeromonas*.

(UNR:<http://www.microfcmunr.com.ar/files/FilesInjuria/2014-Injuria-02B-Bacilos%20gram%20negativos%20fermentadores-Enterobacterias.pdf>),

Microorganismos altamente patógenos para el ser humano y que probablemente están presentes en este manantial termal, donde la mayoría son bacterias inertes que no son nocivas para la salud e indican bajos niveles de contaminación.

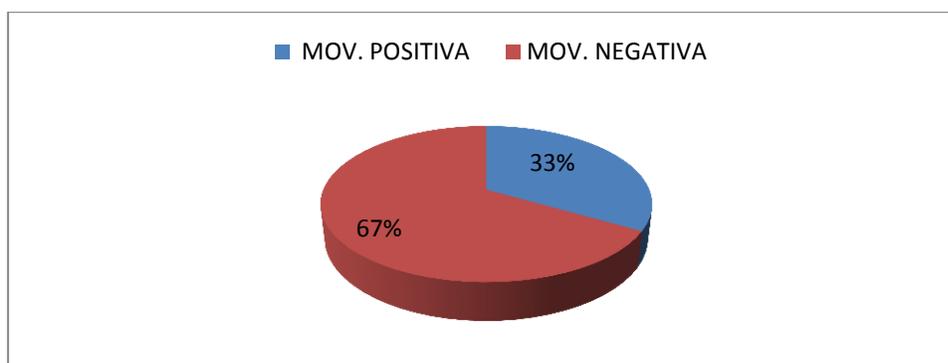
3.2.7. Prueba de Movilidad

Tabla 8-3: Recuento de bacterias con Movilidad positiva y negativa de las aguas termales del Balneario Las Peñas.

SITIO DE MUESTREO	MOVILIDAD		TOTAL
	(+)	(-)	
Ojo de Agua	1	2	3
Piscina	2	4	6
PORCENTAJE %	33	67	100

Realizado por: Pedro Cabrera, 2015

Grafico 7-3: Porcentaje de bacterias con Movilidad positiva y negativa de las aguas termales del Balneario Las Peñas.



Realizado por: Pedro Cabrera, 2015

La siembra de bacterias realizada en Agar Movilidad tiene como objetivo determinar la capacidad de ciertos microorganismos para moverse, característica que poseen las bacterias flageladas, en su mayoría bacilos. Como se muestra en la tabla 7-3 del total de cepas aisladas (9 UFC), el 33% (3 UFC) corresponden a bacterias que poseen esta capacidad, y el 67% (6 UFC) por su parte corresponden a bacterias con movilidad negativa, es decir la mayoría de cepas aisladas de estas aguas resultaron negativas ante esta prueba.

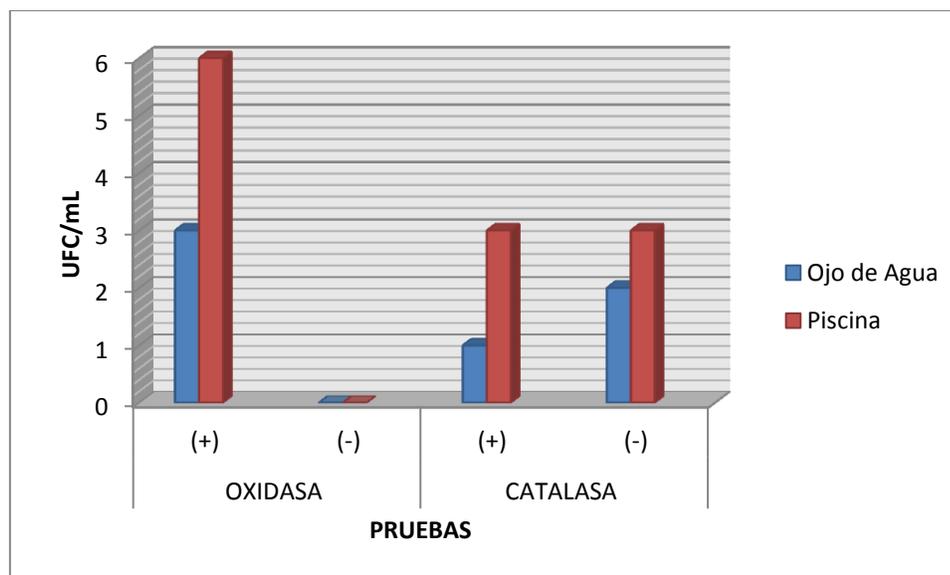
3.2.8. Pruebas Oxidasa y Catalasa

Tabla 9-3: Recuento de bacterias Oxidasa y Catalasa positivas y negativas de las aguas termales del Balneario Las Peñas.

SITIO DE MUESTREO	OXIDASA		CATALASA	
	(+)	(-)	(+)	(-)
Ojo de Agua	3	0	1	2
Piscina	6	0	3	3
PORCENTAJE %	100	0	40	60

Realizado por: Pedro Cabrera, 2015

Gráfico 8-3: Recuento de bacterias Oxidasa y Catalasa positivas y negativas de las aguas termales del Balneario Las Peñas.



Realizado por: Pedro Cabrera, 2015

En la tabla 9-3 se muestra claramente como el 100% de bacterias aisladas (9 UFC) provenientes en su mayoría de la piscina (3 UFC) corresponden a bacterias oxidasa positivas. Fernández indica que esta prueba detecta la presencia de enzimas oxidasas en el microorganismo (FERNÁNDEZ, Ana., et al. 2010. p. 6), lo que quiere decir que el mismo tiene la capacidad de utilizar el oxígeno para la producción de energía con una cadena de transferencia de electrones (Macfaddin. 2003. p. 89) característica que en este caso poseen todas las cepas aisladas en el análisis.

Las géneros que normalmente presentan oxidasa positiva son *Pseudomonadaceae*, para una identificación preliminar de *Neisseria* frente a *Moraxella* las cuales además son diplococos Gram negativas; entre otros están *Helicobacter pylori*, *Vibrio cholerae* y *Campylobacter jejuni*, *Legionella pneumophila*; y entre los que presentan oxidasa negativa tenemos a los Enterobacteriaceae. (Macfaddin. 2003. p. 89)

Por su parte y como se muestra en la misma tabla el 66.6% de las bacterias aisladas (5 UFC) provenientes en su mayoría también de la piscina (3 UFC) corresponden a bacilos catalasa negativos, mientras que el 33.4% de cepas (4UFC) originarias en su mayoría también de la piscina (3 UFC) corresponden a bacilos catalasa positivos. Esta prueba según Fernández, detecta la presencia de una enzima capaz de hidrolizar el peróxido de hidrogeno en agua y oxígeno (FERNÁNDEZ, Ana., et al. 2010. p. 6), indicando por ello que 5 bacterias del total de cepas aisladas tienen esta capacidad. Según Macfaddin esta prueba nos permite distinguir entre *Streptococcus* (catalasa negativa) de *Staphylococcus* (catalasa positiva) y *Clostridium* (negativa) de *Bacillus* (positiva). (Macfaddin. 2003. p. 89)

Luego de realizar esta serie de pruebas descritas hasta el momento, se logró identificar únicamente a una sola cepa, de las 9 aisladas, por lo que se procede a realizar más pruebas bioquímicas con las ocho bacterias restantes, hasta lograr su posterior identificación.

3.2.9. Pruebas Bioquímicas Kligler, SIM, Urea y Citrato

Tabla 10-3: Resultado de las pruebas bioquímicas Kligler, SIM, Urea y Citrato realizadas a las bacterias aisladas de las aguas termales del balneario las Peñas.

N°	Origen	KLIGLER	SIM			UREA	CITRATO
			H2S	INDOL	MOVILIDAD		
5	Ojo de agua	ACIDO/ACIDO	-	-		+	+
11	Piscina	ACIDO/ ALCALINO	-	-	-	-	+
15	Piscina	ALCALINO/ALCALINO	-	-	-	-	-
23	Piscina	ALCALINO/ALCALINO	-	-	+	+	-
27	Piscina	ALCALINO/ALCALINO	-	-	-	-	+
11.2	Ojo de agua	ALCALINO/ALCALINO	-	-	+	-	+
18	Piscina	ALCALINO/ALCALINO	-	-	-	-	+

Realizado por: Pedro Cabrera, 2015

Para la realización de estas pruebas bioquímicas, se eligieron las bacterias descritas en la tabla 10-3, donde se muestra el origen de cada una de ellas y los resultados obtenidos. Según Álvarez, la prueba de Kligler determina la capacidad de una bacteria para metabolizar glucosa y lactosa; la prueba SIM la capacidad de degradar triptófano a Indol; la prueba de Citrato la capacidad de utilizar esta sustancia como única fuente de carbono y la prueba de Urea la capacidad de desdoblar esta sustancia por un proceso de alcalinización. (Álvarez., & Boquet., 1990. p. 115).

Características que hicieron posible la identificación únicamente de la bacteria número 5, y por ende la necesaria aplicación del sistema Microgen para el resto de bacterias aisladas en este análisis.

3.2.10. Total de pruebas realizadas

La siguiente tabla muestra un breve resumen de todas las pruebas realizadas hasta el momento con las 9 cepas bacterianas aisladas de las aguas termales del balneario las Peñas, aquí se detalla también el código, origen y características macroscópicas de cada una de ellas con el objetivo de tener una visión más clara de los resultados obtenidos en este análisis.

Tabla 11-3: Descripción completa de las pruebas realizadas a las bacterias aisladas de las aguas termales del balneario Las Peñas.

N°	Sitio de muestreo	Petrifilm	Descripción Macroscópica	Gram	Oxidasa	Catalasa	Movilidad	OF		Pruebas Bioquímicas					
								Cerrado	Abierto	Kligler	Citrato	Urea	SIM		
													H ₂ S	Indol	Movilidad
4	Ojo de agua	AC	Colonias redondas, pequeñas algo transparentes	Bacilos Gram (-)	+	-	-	+	+						
5	Ojo de agua	AC		Bacilos Gram (-)	+	+	+	-	-	Acido/ acido	+	+	-	-	-
11	Piscina	AC		Bacilos Gram (-)	+	-	+	-	-	Acido/al calino	-	+	-	-	-
15	Piscina	AC	Colonias pequeñas redondas, blancas y cremosas.	Bacilos Gram (-)	+	-	+	-	-	Alcalino/ alcalino	-	-	-	-	-
23	Piscina	EC		Bacilos Gram (-)	+	-	-	-	-	alcalino/ alcalino	-	+	-	-	+
26	Piscina	EC	Colonias pequeñas algo amorfas, amarillentas.	Bacilos Gram (-)	+	-	-	-	-	alcalino/ alcalino	-	-	-	-	-
27	Piscina	EC	Colonias pequeñas redondas, blancas y cremosas..	Bacilos Gram (-)	+	-	-	-	-	alcalino/ alcalino	-	-	-	-	-
11.2	Ojo de Agua	STX	Colonias pequeñas amorfas y de tono amarillento.	Bacilos Gram (-)	+	-	-	-	-	alcalino/ alcalino	+	-	-	-	+
18	Piscina	STX		Bacilos Gram (-)	+	-	-	-	-	alcalino/ alcalino	+	-	-	-	-

AC: placa para conteo de Aerobios Mesófilos

EC: placa par conteo de E.coli/ coliformes

STX: palaca para conteo rápido de Staphylococcus

Realizado por: Pedro Cabrera, 2015

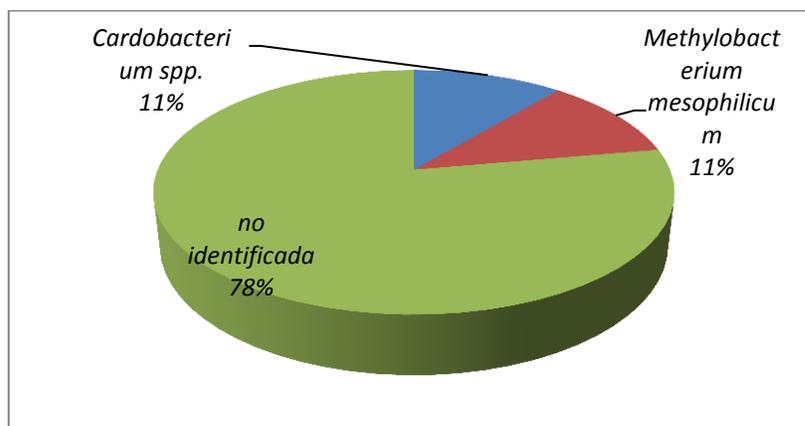
3.2.11. Bacterias identificadas por pruebas bioquímicas.

Tabla 12-3: Bacterias identificadas luego de realizar todas las pruebas descritas en la tabla 11-3.

N°	Origen	Petrifilm	ESPECIE IDENTIFICADA
4	Ojo de Agua	AC	<i>Cardobacterium spp.</i>
5	Ojo de Agua	AC	<i>Methylobacterium mesophilium</i>
11	Piscina	AC	No identificada
15	Piscina	AC	No identificada
23	Piscina	EC	No identificada
26	Piscina	EC	No identificada
27	Piscina	EC	No identificada
11.2	Ojo de Agua	STX	No identificada
18	Piscina	STX	No identificada
TOTAL			9

Realizado por: Pedro Cabrera, 2015

Gráfico 9.-3: Porcentaje de bacterias identificadas posterior al análisis bioquímico realizado



Realizado por: Pedro Cabrera, 2015

Posterior a la realización de todas las pruebas descritas hasta el momento únicamente se han logrado identificar 2 de las 9 cepas aisladas de este manantial termal. La tabla 12-3 muestra en detalle los nombres y el origen de las dos bacterias identificadas.

La bacteria 4 corresponde a *Cardiobacterium spp*, que como señala Sandoval son bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos, sin movilidad, oxidasa positivos y catalasa negativos (SANDOVAL: <http://es.slideshare.net/ANALISIS/cardiobacterium>), características que sin duda concuerdan con el análisis realizado. Además de ello el mismo autor describe que normalmente forman parte de la microbiota bacteriana de la zona nasofaríngea humana (nariz, garganta y boca), se la relaciona con la endocarditis y se transmite cuando el organismo está expuesto a infecciones diversas, por procedimientos quirúrgicos o dentales, o simplemente por el tracto respiratorio. (Sandoval: <http://es.slideshare.net/ANALISIS/cardiobacterium>).

Hardy Diagnostics, describe a esta bacteria como parte de la faringe nasal y la flora del tracto respiratorio superior de los seres humanos, también se ha encontrado en el tracto genitourinario y gastrointestinal. En cuanto a su patogenicidad es un agente etiológico de la endocarditis bacteriana en pacientes con defectos cardiovasculares preexistentes, y también ha estado involucrado en un caso de septicemia fatal en un paciente inmunodeprimido con conocida sin cardiopatía preexistente. (Hardy Diagnostics: https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/Content/hugo/Cardiobacterium.htm).

Y a pesar de que no existen reportes de esta bacteria en aguas, su hallazgo en el ojo de agua de este balneario puede deberse a que probablemente alguno de los encargados de la limpieza del lugar haya estado contaminado con la misma.

La bacteria 5 por su parte corresponde a una *Methylobacterium mesophilicum*, las cuales según Koneman corresponden a bacterias Gram negativas de color rosado, con capacidad de usar el metano en forma facultativa, son oxidasa positivas y móviles, aunque su oxidasa puede ser muy débil, y la detección de movilidad algo complicada, son positivas para catalasa ureasa y amilasa (KONEMAN, Elmer., & ALLEN, Stephen. 2006. P. 322), características que claramente coinciden con las del análisis realizado a las aguas de la Peñas. Además el mismo autor señala que esta misma especie es causante de úlceras cutáneas, infección de catéteres centrales, bacteriemia en pacientes inmunocomprometidos sinovitis y peritonitis. (Koneman, & Allen., 2006. p. 322).

Rice y sus colaboradores en el monitoreo de *Methylobacterium* en sistemas de agua reportaron que este organismo se han aislado del agua del grifo en varios entornos clínicos, incluyendo una investigación de un pseudobrote, el agua de las unidades dentales y unidades de purificación de los bancos de sangre . (Rice.,2000. p.1)

A mas de ello en un estudio realizado por O`Brien se aislaron bacterias pigmentadas rosa a partir de una unidad de purificación del agua de un banco de sangre, un suministro de agua de la ciudad (agua del grifo), y una isla fuente de agua (sin tratar). Cinco del total de cepas aisladas fueron *Methylotrrops* facultativas y se clasificaron como *Methylobacterium biovar mesophilicum* , demostrando que este tipo de bacterias se encuentra frecuentemente presente en aguas. (O`Brien., 1993.p.1)

Kovaleva y sus colaboradores citan que *Methylobacterium spp.* son microorganismos exigentes causantes de contaminaciones cruzadas relacionadas con endoscopios y equipos de reprocesamiento y se han reportado como una causa de infecciones en pacientes inmunocomprometidos. Debido a su crecimiento lento, la bacteria se puede perder fácilmente durante la vigilancia endoscopio de reprocesamiento. La capacidad de formar biopelículas y para exhibir la tolerancia a los agentes de limpieza y de desinfección y de alta temperaturas y secado es probablemente la causa de su predominancia en el ambiente hospitalario, sobre todo en el agua del grifo y los canales del endoscopio. (Kovaleva., et al. 2014. p.1320).

Por ultimo en un caso clinico analizado por Sanders y sus colaboradores se dertermino que *M. mesophilicum* fue identificado por primera vez de fuentes ambientales, por lo que ha habido conjeturas de que las infecciones pueden ser adquiridos de las flores o de la ingestión de vegetales crudos. Un jardinero ávido en diálisis peritoneal desarrolló peritonitis recurrente debido a *Methylobacterium*, *posiblemente relacionadas con su exposición de jardinería*. Otro paciente bañaba con frecuencia en un río donde recibió muchas abrasiones. Y actualmente un nuevo paciente es el primero descrito por haber tenido la exposición definitiva a tierra, hojas, y las lombrices de tierra justo antes de desarrollar una infección producida por esta bacteria. (Sanders., et al. 2000 p. 1).

Datos que indican que el hallazgo de *Methylobacterium mesophilicum* en el ojo de agua del balneario Las Peñas puede deberse probablemente a una contaminación de tipo ambiental por

alguna falla en laproteccion del mismo o quizá a que alguno de los encargados de limpieza del lugar haya estado infectado con la misma.

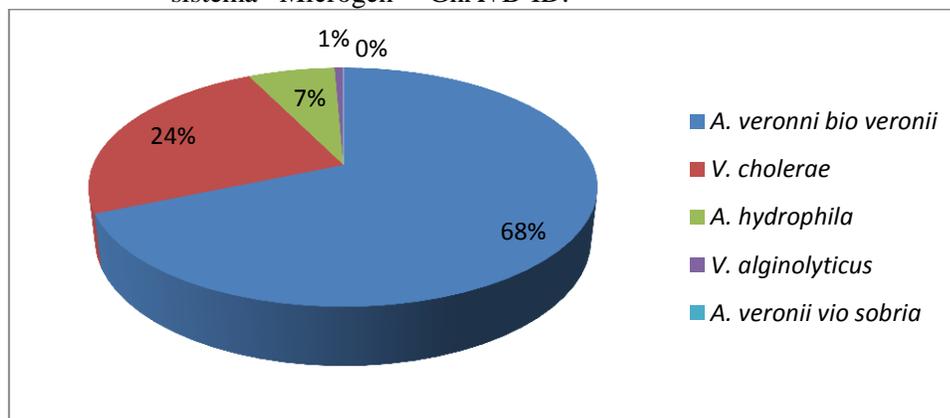
3.2.12. Bacterias identificadas mediante el Sistema Microgen

Tabla 13-3: Bacterias identificadas por sistema Microgen™ GnA+B-ID

Nº	Origen	Petrifilm	ESPECIE IDENTIFICADA
11	Piscina	AC	<i>Aeromonas veronni bio veronii</i>
15	Piscina	AC	<i>Aeromonas veronni bio veronii</i>
23	Piscina	EC	<i>Aeromonas veronni bio veronii</i>
26	Piscina	EC	<i>Aeromonas veronni bio veronii</i>
27	Piscina	EC	<i>Aeromonas veronni bio veronii</i>
11.2	Ojo de Agua	STX	<i>Aeromonas veronni bio veronii</i>
18	Piscina	STX	<i>Aeromonas veronni bio veronii</i>
TOTAL			7

Realizado por: Pedro Cabrera, 2015

Grafico 10-3: Porcentaje de probabilidad de bacterias identificadas por sistema Microgen™ GnA+B-ID.



Realizado por: Pedro Cabrera, 2015

Como se puede observar en la gráfica 10-3, el sistema Microgen genera un informe de los cinco microorganismos con las características más parecidas en una base de datos selectiva, donde la cepa con mayor porcentaje de probabilidad corresponde a la bacteria que se quiere identificar.

Las muestras seleccionadas para este test fueron la 11,15,23,26,27,11.2 y 18, las cuales en las pruebas anteriores demostraron resultados muy similares, por lo que se eligió como muestra representativa a la numero 11, dando como resultado una *Aeromonas veronii bio veronii* con un 68.42 % de probabilidad, bacteria que como reporta la Biblioteca virtual de desarrollo sostenible y salud ambiental de la OPS, corresponde un bacilo Gram negativo, aerobio facultativo, no esporulante con características similares a las *Enterobacteraceae*. (BVSDE: http://www.bvsde.paho.org/cd-gdwq/docs_microbiologicos/Bacterias%20PDF/Aeromonas.pdf),

Quiroga y sus colaboradores citan también que la participación de estos microorganismos en gran variedad de infecciones humanas ha sido documentada mundialmente sugiriendo una etiología compleja en que las cepas poseen una variedad de factores de virulencia en diferentes asociaciones. De entre los síndromes clínicos documentados destacan: bacteriemias y septicemias en pacientes inmunodeprimidos, meningitis tanto en niños como en adultos, peritonitis, infecciones de tejidos blandos y huesos, infecciones del tracto respiratorio en inmunocompetentes e inmunocomprometidos, raras infecciones oculares y síndrome urémico hemolítico. En los últimos años, ha sido informado su aislamiento en prostatitis y shock séptico, fascitis necrotizante, traqueobronquitis, cistitis entre otras infecciones humanas. (Quiroga., et al. 2010. p.1).

Herrera y Saltos con el fin de determinar la Producción de Marcadores fenotípicos de virulencia en cepas de *Aeromonas* Aisladas a partir de agua tratada y de acueductos comunales de la Ciudad de Pamplona, estudiaron la presencia de hemolisinas, proteasas, lipasas, DNasas, y adicionalmente, su resistencia frente a Antibióticos. El 100% de las cepas de *A. hydrophila* y *A. veronii veronii*, demostraron actividad proteolítica, lipolítica, DNasa y hemolítica. Indicando que en el Agua Tratada y la procedente de los acueductos comunales de la ciudad existen cepas de *Aeromonas* potencialmente patógenas y pueden estar relacionadas con gastroenteritis y otras enfermedades. (Herrera., & Saltos., 2012. p.1).

La BVSDE menciona también este dato importantísimo que dice esta especie bacteriana es muy común en el agua dulce, suelo y alimentos como carne o leche, es también capaz de producir septicemias o infecciones en heridas y aparato respiratorio en personas inmunodeprimidas y su

transmisión se asocia al contacto de heridas con suelo contaminado y actividades acuáticas como la natación, el buceo o la pesca.

(BVSDE: http://www.bvsde.paho.org/cd-gdwq/docs_microbiologicos/Bacterias%20PDF/Aeromonas.pdf),

Por lo que queda más que justificada su presencia en estas aguas que son usadas para turismo recreativo y a donde probablemente concurrió una o varios bañistas portadores de la misma.

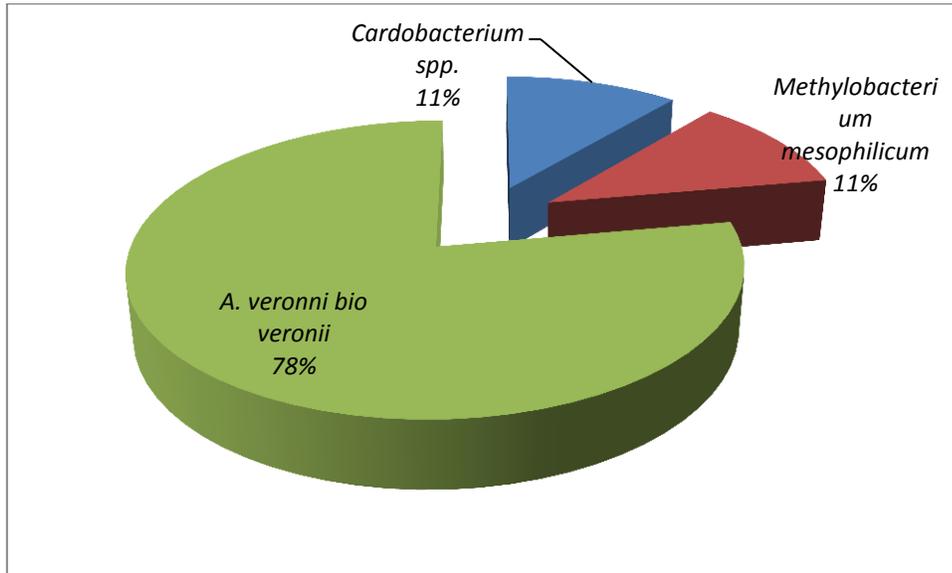
3.2.13. Total de bacterias identificadas en el análisis.

Tabla 13-4: Bacterias identificadas en el análisis realizado a las aguas termales del balneario las Peñas.

Nº	Origen	Petrifilm	ESPECIE IDENTIFICADA
4	Ojo de Agua	AC	<i>Cardobacterium spp.</i>
5	Ojo de Agua	AC	<i>Methylobacterium mesophilium</i>
11	Piscina	AC	<i>Aeromonas veronni bio veronni</i>
15	Piscina	AC	<i>Aeromonas veronni bio veronni</i>
23	Piscina	EC	<i>Aeromonas veronni bio veronni</i>
26	Piscina	EC	<i>Aeromonas veronni bio veronni</i>
27	Piscina	EC	<i>Aeromonas veronni bio veronni</i>
11.2	Ojo de Agua	STX	<i>Aeromonas veronni bio veronni</i>
18	Piscina	STX	<i>Aeromonas veronni bio veronni</i>
TOTAL			9
Porcentaje %			100

Realizado por: Pedro Cabrera, 2015

Gráfico 11-3: Porcentaje final de Bacterias identificadas en el análisis realizado a las aguas termales del balneario las Peñas.



Realizado por: Pedro Cabrera, 2015

Finalmente como se puede observar en la tabla 13-3 se encuentran detalladas cada una de las bacterias identificadas en este análisis, el 100% de las mismas corresponden a bacilos Gram negativos cuya especie predominante es la *Aeromonas veronni bio veronii* con un 78% de incidencia.

El porcentaje restante corresponde en cantidades iguales a las otras dos bacterias identificadas, esto es 11% para la cepa de *Cardobacterium spp* y 11% para la cepa de *Methylobacterium mesophilicum*. Diversidad microbiana que corresponde a los microorganismos de interés sanitario encontrados en las aguas termales del balneario Las Peñas, los mismos que muestran varias falencias en la calidad sanitaria de este manantial y que de no ser erradicado constituye un riesgo para quienes acuden asiduamente a este sitio turístico.

CONCLUSIONES

- Se determinaron los parámetros físico- químicos in situ, demostrando que las aguas termales del balneario las Peñas corresponden a la clase aguas hipertermales ligeramente acidas, de composición bicarbonatada.
- Se aislaron un total de 9 cepas bacterianas puras, las cuales en su totalidad corresponden a bacilos Gram negativos, flora microbiana extrañamente predominante en estas aguas.
- Utilizando las pruebas bioquímicas tradicionales se logró identificar a nivel de género una sola colonia, y a nivel de especie las ocho colonias restantes.
- Con ayuda del Sistema bioquímico Microgen™ GN- ID A+B, se identificaron a nivel de género y especie siete de las nueve colonias aisladas.
- La cepa a la que no se logró identificar la especie corresponde al género *Cardobacterium spp.*, mientras que aquellas que sí pudieron identificarse en cuanto a género y especie corresponden al género *Methylobacterium* con especie *Methylobacterium mesophilicus* y al género *Aeromonas* con especie *Aeromonas veronni bio veronii*.
- Se determinó así que la totalidad de cepas aisladas, encontradas con frecuencia en este manantial constituyen microorganismos patógenos de elevado interés sanitario, indicadores de posibles contaminaciones humanas y ambientales.
- Este estudio constituye el primer estudio microbiológico realizado en el balneario Las Peñas, constituyendo así el primer reporte de aislamiento de *Cardobacterium spp.*, *Methylobacterium mesophilicus* y *Aeromonas veronni bio veronii*. en aguas termales del Ecuador.

RECOMENDACIONES

- Continuar con análisis microbiológicos no solo en este manantial sino en todos los manantiales termales del Ecuador, con el fin de identificar las principales especies microbianas que se encuentran formando parte de la microbiota de los mismos, y no solo especies de interés sanitario, sino también especies de interés ecológico que ofrezcan un aporte a nivel industrial.
- Desarrollar trabajos que permitan determinar si en este balneario existen microorganismos con especies antibacterianas y antifúngicas o tal vez actividades amiolíticas y proteolíticas.
- Es necesario capacitar en cuanto a normas de asepsia y calidad a todos quienes administran los balnearios de aguas termales del país para prevenir posibles contaminaciones.
- En vista de que el Ecuador es un país rico en manantiales termales usados por miles de bañistas, se debería crear una legislación que regule el funcionamiento de estas aguas para garantizar la salud e inocuidad de sus usuarios.
- Socializar y capacitar a los encargados del Parque Acuático Los Elenes, con ello garantizaremos que este análisis sirva para tomar medidas correctivas y para mejorar la calidad sanitaria de este lugar turístico.

BIBLIOGRAFIA

1. **ÁLVAREZ, María., & BOQUET, Ernesto.** Manual de Técnicas en Microbiología Clínica. 2ª ed. Madrid-España. Garsi. 1990. pp. 29-39, 111-144.
2. **ALZAMORA, S. M., et al.** *Conservación de frutas y hortalizas mediante Tecnologías Combinadas.* Depósitos de Documentos de la FAO en Ecuador. Quito-Ecuador. 2004. p. 28.
3. **ANDUEZA, Félix.** Microbiología del agua. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Mérida-Venezuela. Universidad de los Andes Mérida. 2014. p. 9.**ARCOS, Mireya., et al.** Indicadores microbiológicos de contaminación del agua. *NOVA.* Vol.3, nº4. (2005), (Madrid-España) pp. 72-74.
4. **BAILÓN., Lucía., et al.** Atlas de Pruebas Bioquímicas para Identificar Bacterias. México D.F.-México. Universidad Autónoma de México. 2003. pp.16-23.
5. **BORJA, Jackelyn., et al.** Bacterias halotolerantes productoras de hidrolasas aisladas de aguas termales de Tarapoto – Perú. *Ciencia e Investigación.* Vol.15, nº2. (2012), (Tarapoto – Perú) pp.66-70
6. **ROCK, TD., & BROCK, Louise.** Microbiological studies of thermal habitats of the central volcanic region, North Island, New Zealand. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research.* Vol.5, nº2. (1971), (Indiana- EEUU) pp.233-258.
7. **BURBANO, Napoleón., et al.** Aguas Termominerales en el Ecuador. Quito- Ecuador. INAMHI. 2013. pp. 5-13, 40-43.
8. **BVSDE.** *Aeromonas* [en línea]. Buenos Aires: OMS, 2006. [Consulta: 05 de mayo 2015]. Disponible en:
http://www.bvsde.paho.org/cd-gdwq/docs_microbiologicos/Bacterias%20PDF/Bacillus.pdf
9. **Capetillo, Carmen.** *Morfología y estructura bacteriana* [blog]. 2010. [Consulta: 27 de mayo 2015]. Disponible en: <https://microbitos.files.wordpress.com/2010/06/morfologia-y-estructura-bacteriana.pdf>

10. **CODEX STANDARD 108-1981.** *Norma Codex para las Aguas Minerales Naturales. Enmienda 201.* 2008. pp. 1.
11. **Cuidoelagua.org.** *Tipos de agua.* [en línea]. Tijuana: Cuidoelagua.org, 2009. [Consulta: 27 de mayo 2015]. Disponible en: <http://www.cuidoelagua.org/empapate/origendelagua/tiposagua2.html>
12. **DE LA ROSA, Manuel., et al.** *Microbiología en Ciencias de la salud: Conceptos y aplicaciones.* 3ª ed. Madrid-España. Elseiver. 2011. pp.1-5.
13. **DE LA ROSA, J., & MOSSO, M.** *Diversidad microbiana de las aguas minerales Termales.* Panorama actual de las Aguas Minerales y Minero-medicinales en España. Madrid-España. Instituto Tecnológico Geominero de España. 2000. pp. 153-157.
14. **FLORES, Sandra.** *Aislamiento, identificación y detección de microorganismos con actividades biológicas, procedentes de las aguas de los manantiales termales La Mitisús y santa Apolonia del estado de Mérida.* (Tesis). Maestría. Universidad de los Andes, Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Postgrado en Química de Medicamentos. 2013. pp. 71-97.
15. **FAGUNDO, JR., CIMA, A. y GONZÁLEZ, P.** (2007). *Revisión bibliográfica sobre clasificación de las aguas Minerales y Mineromedicinales.* Centro Nacional de Termalismo Víctor Santamarina. Cuba
16. **FAO/OMS** (1981). *Norma Codex para las Aguas Minerales Naturales.* Codex Standard 108-1981. Enmienda 201, 2011. Revisiones 1997,2008.
17. **FERNÁNDEZ, Ana., et al.** *Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio. Procedimientos en Microbiología Clínica.* Vol. 37 (2010), (Madrid-España) pp. 4-7.
18. **GAD Cantón Baños de Agua Santa.** *Cantón Baños de Agua Santa* [en línea]. Baños: Youjoomla, 2010. [Consulta: 03 de febrero 2015]. Disponible en: <http://www.municipiobanos.gob.ec/banos/index.php/es/>

19. **GARCÍA, Pedro., et al.** Microbiología Clínica Práctica. 2ª Ed. Cádiz- España. Repeto. 1994. pp. 79-82.
20. **IES Pando.** *El agua* [en línea]. Oviedo: Sánchez. 2011. [Consulta: 15 de julio 2015]. Disponible en: <http://www.iespando.com/web/departamentos/biogeo/web/departamento/2BCH/PDFs/02agua.pdf>
21. **KONEMAN, Elmer., & ALLEN, Stephen.** Diagnóstico Microbiológico. 6ª ed. Madrid-España. Editorial Médica Panamericana. 2006. p.322.
22. **LÓPEZ, Luis., et al.** Las Tinciones Básicas en el laboratorio de Microbiología. *Investigación en Discapacidad*. Vol. 3 n°1 (2014), (México D.F.-México) pp. 10-17.
23. **Mateos, Pedro.** *Crecimiento Microbiano* [en línea]. Salamanca: Pedro Mateos, 2012. [Consulta: 27 de mayo 2015]. Disponible en: <http://webcd.usal.es/Web/educativo/micro2/tema07.html>
24. **MARAVÉ, Francisco.** Importancia de la medicina termal. *Anales de Hidrología Médica*. Vol. 4 (2008), (Madrid- España) pp.35-50
25. **Microgen bioproducts Ltd.** *Microgen™ Biochemical ID* [en línea]. Los Ángeles: Microgen bioproducts Ltd, 2003. [Consulta: 27 de mayo 2015]. Disponible en: <http://www.microgenbioproducts.com/bacteriology.htm>
26. **MOSSO, María., et al.** Microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario de Valdelateja. *Anales de la Real. Academia Nacional de Farmacia*. Vol. 74 n°E (2008), (Madrid-España) pp.505-521.
27. **MOSSO, María., et al.** Microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario Cervantes. *Anales de la Real. Academia Nacional de Farmacia*. Vol. 72 (2006), (Madrid-España) pp. 285-304
28. **MORA, Darner.** Criterios microbiológicos para evaluar la calidad del agua en sus diferentes usos. *Revista Costarricense de Salud pública*. Vol. 5 n°9 (1996), (San José- Costa Rica) pp. 23-33.

29. **NORMA TÉCNICA ECUATORIANA NTE INEN 1105:1983.** Aguas. Muestreo para examen microbiológico. Primera edición. Confirmación 2012.
30. **NORMA TÉCNICA ECUATORIANA NTE INEN 2169:2013.** Agua. Calidad del agua. Muestreo. Manejo y conservación de muestras. Primera edición. Primera revisión.
31. **NORMA TÉCNICA ECUATORIANA NTE INEN 2176:2013.** Agua. Calidad del agua. Muestreo. Técnicas de muestreo. Primera edición. Primera revisión.
32. **Plataforma solar de Almería.** *Microbiología del agua. Conceptos básicos* [en línea]. Almería: Apella, María., & Araujo, Paula, 2010. [Consulta: 27 de mayo 2015]. Disponible en: https://www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02_Capitulo_02.pdf
33. **PEDROZA, Aura., et al.** Diseño de un medio definido para el cultivo discontinuo de cepas autóctonas de thermus spp. *Revista de la Facultad de ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana.* Vol.4 n°2 (1997), (Cali- Colombia) pp. 130 – 134
34. **SALAS, Henry.** Historia y aplicación de normas microbiológicas de calidad de agua en el medio marino. *Water Science Technology.* Vol.18 n°11 (2000) (México D.F:-México) pp. 1-2.
35. **Termared.** *Aguas Mineromedicinales* [en línea]. Galicia: Termared, 2010. [Consulta: 27 de mayo 2015]. Disponible en: http://www.termared.com/docs/repositorio//es_ES//investigacion/aguas-mineromedicinales.pdf
36. **Universidad de la República.** *Crecimiento Bacteriano* [en línea]. Uruguay: Fagro, 2011. [Consulta: 07 de julio 2015]. Disponible en: http://www.fagro.edu.uy/~microbiologia/docencia/materiales%20teoricos/2011/crecimiento_2011.pdf
37. **Universidad de la Republica.** *Recuento bacteriano* [en línea]. Uruguay: Diana, Leticia, 2015. [Consulta: 27 de mayo 2015]. Disponible en: http://www.fvet.edu.uy/sites/default/files//microbiolog%C3%ADa/RECUESTO%20BACTERIANO%20bolsa_0.pdf
38. **Universidad Pública de Navarra.** *Introducción, morfología y estructura de los microorganismos* [en línea]. Pamplona: Grupo de Investigación de genética y microbiología,

2010. [Consulta: 25 de mayo 2015]. Disponible en:
http://www.unavarra.es/genmic/microgral/01_morfologia_y_estructura.pdf
39. **Universidad de Sevilla.** *Microbiología clínica. Medios de cultivo* [en línea]. Sevilla: Curso 2012-2013, 2013. [Consulta: 27 de mayo 2015]. Disponible en:
<http://asignatura.us.es/mbclinica/docs/recursos/12/medios-de-cultivo.pdf>
40. **ZEIKUS, JG., et al.** Microbiology of Methanogenesis in Thermal, Volcanic Enviroments. *Journal of bacteriology*. Vol. 143 nº1 (1980), (Yellowstone- EEUU) pp. 432-440.
41. **3M Microbiology.** *Recuento de mohos y levaduras. Guía de interpretación Petrifilm™* [en línea]. Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona, 2009. [Consulta: 05 de enero 2015]. Disponible en:
http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat.workshopmrama/files/Petrifilm_guias.pdf
42. **3M Microbiology.** *Recuento de aerobios. Guía de interpretación Petrifilm™* [en línea]. Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona, 2009. [Consulta: 05 de enero 2015]. Disponible en:
http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat.workshopmrama/files/Petrifilm_guias.pdf
43. **3M Microbiology.** *Recuento de E. coli/coliformes. Guía de interpretación Petrifilm™* [en línea]. Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona, 2009. [Consulta: 05 de enero 2015]. Disponible en:
http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat.workshopmrama/files/Petrifilm_guias.pdf
44. **3M Microbiology.** *Sistema de recuento Staph Express. Guía de interpretación Petrifilm™* [en línea]. Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona, 2009. [Consulta: 05 de enero 2015]. Disponible en:
http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat.workshopmrama/files/Petrifilm_guias.pdf

ANEXOS

Anexo A: Balneario Las Peñas



Anexo B: Sitios de Muestreo, ojo de Agua y Psicina



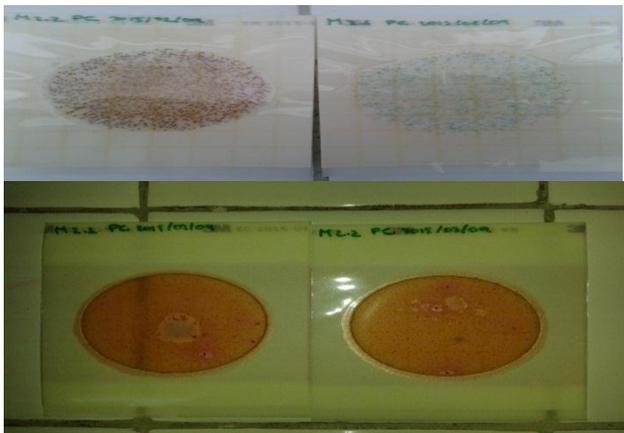
Anexo C: Medicion de parametro fisico quimico in situ.



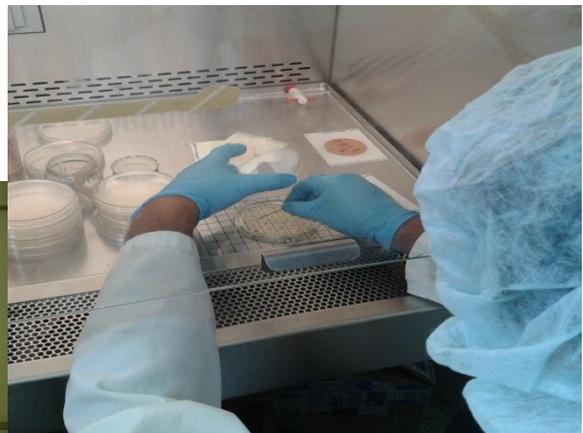
Anexo D: Siembra de muestras en Placas Petrifilm.



Anexo E: Resultado de la siembra en pLacas Petrifilm.



Anexo F: Repique de colonias.



Anexo G: Crecimiento de cepa aisladas.



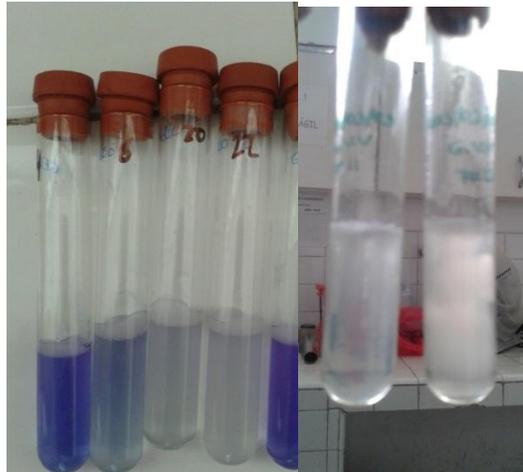
Anexo H: Siembra en estría de colonia aisladas.



Anexo I: Tinción Gram. Bacilos Gram negativos.



Anexo J: Medio O-F y Pruebas de movilidad.



Anexo K: Pruebas Bioquímicas: Kligler, SIM, Urea y Citrato.



Anexo L: Sistema de identificación Microgen GN- ID A+B.



Anexo M: Reporte de resultados. Sistema de identificación Microgen GN- ID A+B.

**GN-ID[®] A+B PANEL
REPORT FORM**

Lab. No. _____ Specimen Type: GVV 11 Vanesa Ventimilla
Date: 2015/05/09

Well Number	GNA wells												GNB wells																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24							
Reaction	Oxidase	Motility	Nitrate	Lysine	Ornithine	H ₂ S	Glucose	Mannitol	Xylose	ONPG	Inchle	Urease	VP	Citrate	TDA	Gelatin	Malonate	Inositol	Sorbitol	Rhamnose	Sucrose	Lactose	Arabinose	Adonitol	Raffinose	Salicin	Arginine				
Result	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
Reaction Index	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1				
Sum of Positive Reactions	5			4				0				0				5				4				0				0			

Octal Code: _____ Final Identification: _____

WF#125/08/02

Microgen ID

Microgen GNA + B Oxidase Positive

Specimen Details

Lab Ref.: PC11
 Name: Pedro Cabrera
 Specimen Type:
 Source (ward/location):

Date:

Results Entry

Octal Code: 776654100

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

Identification Analysis

	<i>A.veronii bio veronii</i>	<i>V.cholerae</i>	<i>A.hydrophila</i>	<i>V.alginolyticus</i>	<i>A.veronii bio sobria</i>
Select ID Choice	Yes	No	No	No	No
Probability	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000
Percent Probability	48.42%	44.08%	6.58%	0.66%	0.14%
Likelihood	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%
Human Isolate	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Tests against					
Test 1	H2S (0.1%)	H2S (0.1%)	TDA (0.1%)	H2S (0.1%)	H2S (0.1%)
Test 2	TDA (0.1%)	TDA (0.1%)	ORN (1%)	TDA (0.1%)	TDA (0.1%)
Test 3	SAL (83%)	CIT (96%)	H2S (5%)	ONP (10%)	ORN (2%)
Additional Tests	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Growth in 6% NaCl	0%	84%	14%	99.9%	0%
Esculin Hydrolysis	91%	10%	84%	34%	5%
Growth in 0% NaCl	99.9%	99.9%	99.9%	0.1%	99.9%
Growth on SS Agar	0%	92%	97%	77%	0%
Additional Comments	8				7
	7 Previously A.sobria				
	8 Previously A.veronii				

Identification Comments

Unacceptable Identification of *Aeromonas veronii bio veronii*
 The strain is not typical (multiple tests are against), and it is poorly separated from other suggested identification choices
 ADDITIONAL TESTS MAY IMPROVE THE IDENTIFICATION.