



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LAS AGUAS TERMALES EN LA COMUNIDAD CUNUYACU UBICADO EN LA PARROQUIA PASTOCALLE PERTENECIENTE A LA PROVINCIA DE COTOPAXI

Trabajo de titulación presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

AUTORA: CYNTIA LEONELA BENAVIDES CAMPAÑA

TUTOR: DR. GERARDO EMILIO MEDINA RAMIREZ

Riobamba-Ecuador

2017

©2017, Cyntia Leonela Benavides Campaña

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que: El trabajo de investigación: “**ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LAS AGUAS TERMALES EN LA COMUNIDAD CUNUYACU UBICADO EN LA PARROQUIA PASTOCALLE PERTENECIENTE A LA PROVINCIA DE COTOPAXI**”, de responsabilidad de la señorita Cyntia Leonela Benavides Campaña, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal de Trabajo de Titulación, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Dr. Gerardo Medina

DIRECTOR

.....

Dr. Carlos Espinoza

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

.....

Yo, Cytia Leonela Benavides Campaña soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Cytia Leonela Benavides Campaña

DEDICATORIA

A Dios por ser mi soporte y fuerza, por darme el valor para levantarme cuando me he visto caída y todo perdido y sobre todo por darme la vida llena de alegrías y tristezas para poder superar mis retos y alcanzar mis metas.

A mis padres Juan y Greta por ser el apoyo más grande y ejemplo a seguir, por creer en mí aun cuando yo misma no lo hago y sobre todo por ser mis amigos más fieles y estar a mi lado en todo momento y enseñarme a salir de las adversidades y no rendirme jamás y hacerme ver que la vida es bella a pesar de los problemas, dándome su amor, cariño y apoyo incondicional.

A mis hermanos Karolina y Byron por ser mis ángeles en la tierra, mi alegría, mis compañeros de vida y travesuras, por estar en las buenas y malas y dándome ánimos aun cuando todo lo he visto perdido.

A mi hijito Andrés por ser mi inspiración, mis fuerzas y mis ganas de salir adelante, por llegar a mi vida en el momento indicado y hacerme ver lo bello que es ser su madre y porque desde el momento que le tuve en mis brazos me ha enseñado que el verdadero amor existe, regalándome una sonrisa que me ayuda a no rendirme y seguir adelante persiguiendo mis metas y llenando mi corazón de alegría, amor y ternura por él y para él.

Cyntia

AGRADECIMIENTO

A Dios por darme la vida, la salud para seguir adelante en esta etapa y ayudarme a no rendirme por más grandes obstáculos que encuentre en mi camino.

A mis padres por todo el apoyo emocional, moral y económico por ser la inspiración para culminar mi vida estudiantil.

A Rogelio por el apoyo brindado durante mi vida estudiantil y las facilidades brindadas para la ejecución del presente trabajo.

A las Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, especialmente la Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia por brindarme la oportunidad de prepararme y conocer personas que me han ayudado a mejorar en todos los aspectos de mi vida y me han dejado lecciones que me han fortalecido como ser humano y que también me servirán como futura profesional.

Al Dr. Gerardo Medina por todo el entusiasmo, interés y apoyo que me dio durante el desarrollo de este trabajo, convirtiéndose a más de mi ejemplo como maestro en un amigo.

Al Dr. Carlos Espinoza por su cooperación, contribución, apoyo y paciencia como docente y amigo para llevar a cabo la presente investigación

Al Sr. Roberto Toapanta presidente del GADPR de San Juan de Pastocalle por todas las atenciones, facilidades y predisposición brindadas para la ejecución de este trabajo.

Cyntia

TABLA DE CONTENIDO

	Páginas
RESUMEN	xvi
SUMMARY.....	xvii
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I	
1. MARCO TEÓRICO	5
1.1 Agua	5
1.2. Aguas minerales	7
1.2.1. Tipos de aguas minerales.....	8
1.2.2. Clasificación de las aguas minerales.....	8
1.2.3. Aguas Mineromedicinales	13
1.3. Aguas termales	13
1.3.1. <i>Origen de las aguas termales</i>	13
1.3.2. <i>Beneficios de las aguas termales</i>	14
1.4. Controles de calidad de las aguas termales.....	15
1.5. Contaminación del agua	16
1.5.1. <i>Contaminantes del agua</i>	18
1.6. Microbiología.....	18
1.6.1. <i>Microorganismos</i>	19
1.6.2. <i>Morfología bacteriana</i>	19
1.6.3. <i>Análisis microbiológico de las aguas termales</i>	21
1.6.4. <i>Microorganismos presentes en las aguas minerales termales</i>	23
1.7. Recuento e Identificación microbiana.....	25
1.7.1 <i>Placas Petrifilm</i>	26
1.7.2. <i>Medios de Cultivo</i>	26

1.7.3.	<i>Clasificación de los medios de cultivo</i>	27
1.8	Aislamiento de microorganismos	39
1.8.1.	<i>Cultivo puro</i>	39
1.9.	Pruebas bioquímicas	39
1.9.1	<i>Prueba de la Catalasa</i>	39
1.9.2	<i>Prueba de la Oxidasa</i>	40
1.9.3	<i>Prueba de la coagulasa</i>	41
1.9.4.	<i>Crecimiento en caldo hipersalino</i>	41
1.9.5.	<i>Prueba Óxido-Fermentación (OF)</i>	41
1.9.6.	<i>Prueba del agar hierro de Kligler</i>	42
1.9.7.	<i>Prueba del agar Simmons Citrato</i>	42
1.9.8.	<i>Prueba de la Ureasa</i>	43
1.9.9.	<i>SIM</i>	43
1.9.10	<i>Hidrólisis de la gelatina</i>	43
1.9.11	<i>Hidrólisis del almidón</i>	44
1.10.	Antimicrobiano	44
1.10.1.	<i>Antibiótico</i>	44
1.11.	Resistencia antimicrobiana	44
1.11.1	<i>Causas de la resistencia a los antibióticos.</i>	45
1.11.2.	<i>Tipos de resistencia</i>	45
1.11.3.	<i>Mecanismos de resistencia</i>	46
1.11.3.2.	<i>Transferencia vertical de genes</i>	46
1.12.	Antibiograma	49
1.12.1.	Discos de antibiograma	50
1.12.2.	<i>Discos utilizados para pruebas específicas de identificación bacteriana</i>	52
1.12.3.	<i>Difusión del agar</i>	55
1.12.4.	<i>Medición del Halo de inhibición</i>	56

CAPITULO II

2.	MARCO METODOLOGICO.....	57
2.1	Lugar de investigación.....	57
2.1.1.	<i>Aguas Termales Cunuyacu de Pastocalle provincia de Cotopaxi</i>	58
2.1.2	<i>Parroquia Pastocalle</i>	58
2.1.3.	<i>Aguas Termales Cunuyacu</i>.....	59
2.2	Tipo de estudio	60
2.3	Población.....	60
2.4	Muestra	60
2.5	Tamaño de la muestra	60
2.6	Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	61
2.7.	Procesamiento y plan de análisis de datos	61
2.8	Materiales, equipos y reactivos	61
2.8.1	<i>Material Biológico</i>.....	62
2.8.2	<i>Materiales</i>	62
2.8.3	<i>Equipos</i>	64
2.8.4	<i>Reactivos</i>.....	65
2.9	Métodos y técnicas	65
2.9.1	<i>Muestreo</i>	65
2.9.2.	<i>Recolección de la muestra</i>.....	65
2.9.3.	<i>Identificación de las muestras</i>	66
2.9.4	<i>Análisis Físico-Químico in situ</i>	66
2.9.5.	<i>Trasporte de las muestras</i>	67
2.9.6	<i>Análisis Microbiológico</i>	67

CAPITULO III

3.	MARCO DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	86
3.1	Parámetros Físico-químicos medidos in situ del agua termal de Cunuyacu	86
3.2	Recuento de bacterias aerobias mesófilos en las aguas termales de Cunuyacu.	88
3.3	Recuento de <i>Escherichia coli</i> y Coliformes presentes en las aguas de Cunuyacu	90
3.4	Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> en las aguas termales de Cunuyacu	93
3.5	Recuento de Mohos y Levaduras presentes en las aguas termales de Cunuyacu	95
3.6	Recuento de colonias en agar Eosina azul de metileno y Manitol salado,	97
3.7	Morfología microscópica de los clones de las aguas termales de Cunuyacu.....	99
3.8	Pruebas Bioquímicas para la identificación de Cocos Gram Positivos	101
3.9	Pruebas Bioquímicas para la identificación de Bacilos Gram negativos	112
3.10.	Pruebas bioquímicas para la identificación del Bacilo Gram positivo	117
3.11	Identificación de los clones bacterianos aislados de las aguas de Cunuyacu ..	119
3.12	Evaluación de la resistencia antimicrobiana de los cocos Gram positivos	123
3.13.	Evaluación de la resistencia antimicrobiana de los Bacilos Gram negativos .	127
3.13.	Evaluación de la resistencia antimicrobiana del Bacilo Gram positivo aislado	130
	CONCLUSIONES.....	132
	RECOMENDACIONES.....	133
	BIBLIOGRAFIA	
	ANEXOS	

INDICE DE TABLAS

	Páginas
Tabla 1-1. Olores característicos del agua y su origen.....	6
Tabla 1-2: Clasificación dependiendo de la temperatura del agua.....	9
Tabla 1-3: Clasificación dependiendo de su tonicidad.	9
Tabla 1-4: Clasificación dependiendo de su pH.	10
Tabla 1-5: Clasificación dependiendo de los valores de residuos secos	10
Tabla 1-6: Clasificación Dependiendo de los valores de Salinidad.	11
Tabla 1-7: Clasificación dependiendo de su composición química-física	12
Tabla 1-8: Enfermedades por patógenos contaminantes del agua	17
Tabla 1-9 : Coloración de algunas cepas de microorganismos en el medio EAM.....	30
Tabla 1-10: Aspectos de crecimiento de microorganismos en Agar Manitol Salado.	31
Tabla 1-11: Hemólisis en Agar Sangre	32
Tabla 1-12: Aspectos de crecimiento de microorganismos en Agar MacConkey	33
Tabla 1-13: Aspectos de crecimiento de microorganismos en Agar <i>Salmonella Shigella</i>	34
Tabla 1-14: Morfología colonial	38
Tabla 1-15: Tamaño de las colonias	38
Tabla 1-16: Discos utilizados para el antibiograma.....	52
Tabla 2-1: Preparación y composición de Agar utilizado para la hidrólisis de gelatina	79
Tabla 2-2.: Composición y preparación del Agar utilizado para la hidrólisis del Almidón.....	80
Tabla 2-3: Resultados del crecimiento bacteriano del microorganismo en agar Kligler.	82
Tabla 3-1: Parámetros Físico-químicos del muestreo del agua termal de Cunuyacu	86
Tabla 3-2: Recuento de bacterias aerobias mesófilas en las aguas termales de Cunuyacu.....	87
Tabla 3.3: Recuento de <i>Escherichia coli</i> y Coliformes en las aguas termales de Cunuyacu.....	89
Tabla 3-4: Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> en las aguas termales de Cunuyacu.....	91
Tabla 3-5: Recuento de Mohos y levaduras de las aguas termales de Cunuyacu.....	93
Tabla 3-6: Recuento de colonias que fermentaron o no lactosa y manitol.....	95
Tabla 3-7: Morfología microscópica de los clones bacterianos aislados.....	97
Tabla 3-8: Pruebas Bioquímicas para la identificación de Cocos Gram Positivos.....	100

Tabla 3-9: Pruebas Bioquímicas para la identificación de Cocos Gram Positivos.....	102
Tabla 3-10: Pruebas Bioquímicas para la identificación de Cocos Gram Positivos.....	105
Tabla 3-11: ...Pruebas Bioquímicas para la identificación de Bacilos Gram negativos.....	109
Tabla 3-12: ...Pruebas bioquímicas para la identificación del bacilo Gram positivo.....	113
Tabla 3-13: ...Identificación de las colonias aisladas las aguas termales de Cunuyacu.....	116
Tabla.3-14: Antibiograma de los cocos Gram positivos de Cunuyacu.....	122
Tabla 3-15: Antibiograma de los bacilos Gram negativos de Cunuyacu.....	126
Tabla 3-16: ...Antibiograma del bacilo Gram positivo de Cunuyacu.....	128

INDICE DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1-1: Estructura molecular del agua.....	5
Figura 1-2: Origen de las aguas termominerales	14
Figura 1-3: Disposición de los cocos bacterianos.....	20
Figura 1-4: Disposición de los bacilos.....	20
Figura 1-5: Vibrio, Espirilo, Espiroqueta	21
Figura 1-6: Placas Petrifilm 3M.....	26
Figura 1-7: Medios de Cultivo.....	27
Figura 1-8: Agar E.A.M.....	30
Figura 1-9: Agar Manitol Salado	31
Figura 1-10: Agar Mueller- Hinton	32
Figura 1-11: Hemólisis Alfa, Beta y Gamma	33
Figura 1-12 : Coloración Gram.....	35
Figura 1-13: Pared celular de las bacterias Gram negativas	36
Figura 1-14: Pared celular de las bacterias Gran Positivas.....	36
Figura 1-15: Morfología de colonias bacterianas	37
Figura 1-16: Prueba de la Catalasa	40
Figura 1-17: Prueba de la Oxidasa.....	40
Figura 1-18: Prueba de la Coagulasa	41
Figura 1-19: Trasferencia horizontal de genes.....	47
Figura 1-20: Mecanismos de resistencia antimicrobiana	49
Figura 1-21: Antibiograma de las aguas termales de Cunuyacu.....	50
Figura 1-22: Guía para la selección de antimicrobianos.....	51
Figura 1-23: Prueba de optoquina.....	53
Figura 1-24: Sensibilidad a la Novobiocina.....	54
Figura 1-25: Prueba de la sensibilidad a la Bacitracina.....	55
Figura 1-26: Medición del Halo de inhibición.....	56

Figura 2-1:	Sitios de muestreo de las aguas termales de Cunuyacu	57
Figura 2-2:	Mapa de ubicación del cantón Latacunga	58
Figura 2-3:	Aguas termales Cunuyacu.....	59
Figura 2-4:	Siembra en placas 3M y agares eosina y manitol	70
Figura 2-5:	Primer repique de las colonias	71
Figura 2-6:	Crecimiento de siembra por agotamiento de estrías	72
Figura 2-7:	Resultado de coagulasa positiva (derecha), Coagulasa negativa (izquierda).....	77
Figura 2-8:	Antibiograma con sensibilidad (halo) y resistencia microbiana	85

INDICE DE GRAFICOS

	Páginas
Gráfico 1-3: Recuento de bacterias aerobias mesófilas de las aguas termales de Cunuyacu.....	89
Gráfico 2-3: Recuento de <i>Escherichia coli</i> y Coliformes de las aguas termales de Cunuyacu.....	91
Gráfico 3-3: Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> de las aguas termales de Cunuyacu.....	93
Gráfico 4-3: Recuento de Mohos y levaduras de las aguas termales de Cunuyacu	95
Gráfico 5-3: Porcentaje total de colonias fermentadoras y no fermentadoras	98
Gráfico 6-3: Porcentaje total de clones bacterianos por tinción Gram y morfología.....	100

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo es especificar el tipo de microbiota existente y su perfil de resistencia a variados antibióticos que tienen las aguas termales de Cunuyacu de la provincia de Cotopaxi. Se realizó un análisis físico-químico in situ en el que se determinó el pH y la temperatura, análisis microbiológico, por siembra en placas Petrifilm para aerobios mesófilos, *Escherichia coli* y coliformes, *Staphylococcus aureus*, mohos y levaduras, posterior a esto se procedió al recuento, descripción macroscópica y la selección de las colonias más representativas. Se lograron obtener cepas de clones puros utilizando el método de siembra por agotamiento y repiques en agar Mueller Hinton, las bacterias aisladas se identificaron mediante tinción Gram y pruebas bioquímicas específicas, el antibiograma se llevó a cabo con el método de difusión en agar. Las aguas termales de Cunuyacu fueron ubicadas como hipotermas y ligeramente ácidas, existió la presencia de *Escherichia coli* y notablemente el predominio de cocos Gram positivos. Se aislaron 106 cepas bacterianas de las cuales se identificaron 25 correspondientes a las especies *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *Streptococcus viridans*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus saprofiticus*, *Citrobacter amalonaticus*, *Pseudomonas spp*, *Enterobacter cloacae* y *Bacillus spp*. El antibiograma para el caso de los cocos Gram positivos mostró sensibilidad a la nitrofurantoína y resistencia a la mayoría de antibióticos. Los clones de bacilos Gram negativos aislados son sensibles a la ciprofloxacina y a la estreptomina, la mayoría presenta resistencia bacteriana como la carbenicilina que muestra resistencia en todos sus clones aislados. El bacilo Gram positivo muestra resistencia para la ampicilina, amoxicilina más ácido clavulánico, ceftriazona, nitrofurantoína, cefalotina, oxaciclina, penicilina, tetraciclina y vancomicina. En conclusión estas aguas termales no son un riesgo sanitario para las personas que visitan este lugar, sin embargo hay que tomar medidas que eviten o disminuyan la contaminación del agua.

Palabras clave: <BIOQUÍMICA>, <MICROBIOLOGÍA>, <ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO>
<AGUAS TERMALES> <MICROBIOTA> <PLACAS PETRIFILM> <PRUEBAS
BIOQUÍMICAS> <ANTIBIOGRAMA>.

SUMMARY.

The aim of the present research work is specific the kind of existing microbiota and its profile of resistance to various antibiotics that have the Cunuyacu thermal waters in the Province of Cotopaxi. It was realized a physicochemical analysis in situ, which determines the pH and the temperature, microbiologic analysis, by planting in Petrifilm plate system for aerobic mesophilic, *Escherichia coli* and coliformes, *Staphylococcus aureus*, molds and yeasts, then it was proceeded to recount, macroscopic description and selection of the most representative colonies. It was achieved to obtain clones of pure strains, using the planting system by depletion and chimes in agar Mueller Hinton, the isolated bacteria were identified through Gram staining and biochemical specific tests, the antibiogram was carried out with diffusion in agar method. The thermal waters Cunuyacu were located like hypothermal and slightly acid, it was existed the presence of *Escherichia coli* and significantly and the prevalence of Gram positive cocci. It was isolated 106 bacterial strains, which were identified 25 corresponding to the species of *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *Streptococcus viridans*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus saprofiticus*, *Citrobacter amalonaticus*, *Pseudomonas spp*, *Enterobacter cloacae* and *Bacillus spp*. The antibiogram for Gram positive cocci case shown the sensibility to the nitrofurantoin and resistance to the majority of antibiotics. Isolated Gram negative bacillus clones are sensitive to ciprofloxacin and streptomycin, most of which have bacterial resistance such as carbenicillin showing resistance in all of their isolated clones. The Gram positive bacillus shown the resistance for the ampicillin, amoxicillin more acid clavulanic, ceftriaxone, nitrofurantoin, cephalothin, oxacillin, penicillin, tetracycline and vancomycin. In conclusion these thermal waters are not a health risk, for people who visit this place, however, measures must be taken to avoid or reduce water pollution.

Clue words: <BIOCHEMICAL, <MICROBIOLOGY>, < MICROBIOLOGICAL ANALYSIS>
<THERMAL WATERS> <MICROBIOTA> < PETRIFILM PLATES> < BIOCHEMICALS
TEST> <ANTIBIOGRAM>.

INTRODUCCIÓN

El agua se ha usado por el hombre ancestralmente con tres fines: religiosos, higiénicos y curativos. La limpieza con agua se ha asociado desde la antigüedad a numerosas prácticas religiosas, en especial a los ritos de purificación. Estas prácticas todavía son importantes en la religión musulmana, judía e hindú. (Sánchez, 2013)

Los hallazgos más antiguos de construcciones dedicadas para este fin aparecen de antes del año 2000 a.C. en India. Existen también referencias de las mismas en diferentes textos griegos, como La Ilíada de Homero. En la Antigua Roma, y Grecia el baño era considerado como un ritual. Los primeros registros del uso de agua caliente en las "termas" son a finales del siglo V A.C (Rojas, 2011)

Varias clases de termas como las terapéuticas o balnearios de aguas termales las cuales además tenían un significado simbólico sagrado y los baños públicos como por ejemplo el de Caracalla y Diocleciano ubicados en Roma. (Termalismo Uruguay, 2016)..

En el año 25 antes de Cristo cuando el emperador Agripa, diseñó y creó en Roma las primeras grandes termas de origen público, aunque los romanos ya utilizaban las aguas termales desde hacía doscientos años. (Caldaria, 2016)

Al principio las casas de baño solían ser de carácter vecinal y se extendían a lo largo de las ciudades en pequeños edificios comunitarios. Esos primeros baños públicos fueron llamados 'balneas termas'. Había ya entonces una diferenciación entre espacios de baño privados, llamados balnes o balneum y los espacios públicos, denominados thermae o therma. (Caldaria, 2016)

En los siglos XVI, XVII florece un interés por las aguas medicinales entre las clases aristocráticas, interesadas por el termalismo y más aún por la terapia de las aguas. El despertar del Renacimiento conducido por los hombres del arte y de la ciencia se inspira de nuevo en la cultura y los monumentos de la antigüedad para el nuevo viaje a las aguas. (Rojas, 2011)

En los siglos XVII y XVIII, los médicos de origen alemán Ovelgun y Hoftmann a través de sus estudios y publicaciones, dieron un fuerte impulso a la hidroterapia. Las técnicas que se utilizaban en esta época eran sangrías, purgantes y enemas, pero la hidroterapia elimino estas técnicas, cambiándolas por tratamientos menos agresivos que no lastimaban ni dañaban a los enfermos,

dejando que la dieta, la naturaleza, la tolerancia y el agua curaran sus males (Termalismo Uruguay, 2016).

Actualmente la Hidrología Médica como una ciencia Terapéutica tiene apoyo en otras ciencias como Ciencias Naturales, Farmacia, Fisiología, Química; una de sus ramas es la Crenoterapia que estudia las aguas termales y minerales para el tratamiento de enfermedades. Se conoce el origen, la composición química de las aguas y los beneficios que aportan a la salud, pero a pesar de esto han perdido el espacio que antes ocupaban por los avances recientes de la Medicina. (Martinell, 2013)

En el siglo XIX inició el estudio microbiológico del agua encausándose principalmente en los microorganismos patógenos en el control de enfermedades. Las primeras investigaciones en aguas minerales fueron realizadas en España en el año de 1838, conducidas a conocer cuáles eran las condiciones de existencia de los microorganismos así como también comprobar si existía o no en ellas bacterias patógenas. (Martinell, 2013)

En estudios microbiológicos de las aguas termales se han logrado aislar nuevas bacterias termófilas, las cuales podrían ser útiles en el campo de la biotecnología pues sus enzimas resisten elevadas temperaturas. (De La Rosa Y Mosso, 2000, pp. 154-155)

Algunas investigaciones realizadas en el año 2000 por De La Rosa y Mosso han permitido especificar que en las aguas minerales termales de los balnearios existe una microbiota autóctona dependiente de las propiedades fisicoquímicas del agua, así como microorganismos alóctonos que provienen de otros hábitats.

Vendrell en el año 1998 en un estudio de los microorganismos patógenos en la fuente termal de Tinteiro en Ourense, reporta la presencia de microorganismos patógenos humanos como coliformes fecales, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus*, *Clostridium*, *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de aguas residuales que desembocan en sitios cercanos a la fuente o en ella por infiltraciones en el suelo, que hace que el agua no sea potable.

En Ecuador el Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología (INAMHI) se encuentra realizando estudios hidrogeológicos en los que monitorean las fuentes termales del país para caracterizarlas mediante parámetros físico-químicos y la composición iónica. (Burbano, 2013)

En estudios anteriores realizados por Andueza y colaboradores en el año 2015 se aislaron cepas de *Pseudomonas aeruginosa* en las aguas termales tomadas en la provincia de Chimborazo Ecuador,

en donde además de encontrar dicho organismo se encontró *Pseudomona putida* y *Pseudomona stutzeri*

Sobre estas cepas se realizaron estudios de resistencia a antibióticos a través del método de difusión de Kirby y Bauer, encontrando que todos los microorganismos mostraron sensibilidad a la vancomicina y resistencia a la ampicilina y ampicilina-sulbactam, además una parte de estas cepas presentaron resistencia a los antibióticos (amikacina, ceftazidime, cefepime y ciprofloxacina). (Andueza, 2015, p. 160)

El Ecuador se encuentra ubicado en el Círculo de Fuego del Pacífico, por lo que existen alrededor de 167 manantiales termales y minerales, que se encuentran ubicados principalmente a lo largo del callejón Interandino, estas aguas son utilizadas muy frecuentes por sus propiedades terapéuticas. (Burbano, 2015)

En Ecuador una de las actividades importantes desde el punto de vista económico es particularmente el turismo de aguas termales, las cuales han sido utilizadas por sus propiedades medicinales, relajantes y recreacionales desde el tiempo de los ancestros. Actualmente son lugares de distracción y recreación familiar. (Burbano, 2015)

En las fuentes termales pueden existir microorganismos autóctonos, pero también pueden estar presentes microorganismos alóctonos, procedentes de otros hábitats o de otro tipo que son considerados contaminantes y que pueden ser nocivos para la salud de las personas que frecuentan estos lugares. En ellas también puede haber microorganismos que no han sido identificados y que pueden ser utilizados para diversos fines como en la industria alimentaria, farmacéutica o en la biotecnología. (Burbano, 2015)

Hay un gran interés por el estudio de la biodiversidad de los ambientes extremos con el fin de determinar cuáles son las características particulares que permiten a los microorganismos sobrevivir e identificar las funciones que desempeñan en los ciclos de la naturaleza. Otro aspecto importante a analizar es la resistencia microbiana que puede existir en las bacterias presentes debido a que las personas que concurren a este lugar llevan diferentes microorganismos en su piel y estos se adaptan a las condiciones del medio y generan resistencia.

En los últimos años se han descrito varios tipos de comunidades microbianas en diferentes manantiales termales y se han aislado un gran número de nuevas bacterias termófilas. Estos aspectos se han incrementado con estudios sobre la aplicación de estos microorganismos en la biotecnología y farmacología debido a la alta resistencia al calor de sus enzimas. Además existe una

gran preocupación por la presencia de un microorganismo altamente patógeno como es la *Legionella pneumophyla*, que menciona en un reporte de Gratacós en el año 2012.

El Centro de Control de Enfermedades hace mención que un aproximado del 70% de las infecciones que presentan pacientes ingresados y hospitalizados presentan resistencia a los antibióticos, la Organización Mundial de la Salud OMS refiere que en el año 2012 se incrementó la resistencia a los medicamentos contra el VIH. (FDA, 2007) (Pérez, 1998, p.58) (OMS, 2016)

Actualmente las agua termales de Cunuyacu presentan condiciones que pueden influir para que estas sean una fuente de microorganismos los cuales pueden o no ser patógenos, por lo que si no se realiza este análisis microbiológico las personas que acuden a este lugar no solo estarían expuestas a contraer algún tipo de bacteria que presenta resistencia, sino que además pudieran contraer enfermedades severas y difíciles de tratar.

El presente análisis microbiológico de las aguas termales de Cunuyacu está orientado a determinar tanto la microbiota autóctona como alóctona que existe en dichas aguas y además el perfil de resistencia a los diferentes antibióticos, pues en estas aguas no se han realizado estudios microbiológicos anteriores que indiquen o garanticen la calidad microbiológica y sanitaria de estas aguas usadas en diferentes fines.

Además este análisis microbiológico servirá de base para estudios a futuro en los que se encuentren nuevos e innovadores usos a los microorganismos presentes en las aguas termales, que sean de utilidad en diferentes campos como la biotecnología, la industria de alimentos y farmacéutica o que contribuyan con el desarrollo de la parroquia Pastocalle y de la provincia de Cotopaxi.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Agua

El agua es una de las sustancias esenciales para la supervivencia de todas las formas conocidas de vida, es el componente más abundante en la corteza terrestre cubriendo un 71% de su totalidad, el 96,5% está presente en los océanos y el 1,74% corresponde a los depósitos subterráneos y glaciares continentales. (ECURED, 2017, p. 1)

Según la Real Academia Española el agua es una sustancia que se forma a partir de la combinación de dos átomos de hidrógeno y uno de oxígeno (Figura 1-1), siendo estables gracias a que se encuentran unidos por enlaces covalentes. En el átomo de oxígeno se encuentra la mayor densidad electrónica ya que atrae hacia sí mismo los electrones presentes en los enlaces covalentes, la molécula puede unirse a otras sustancias polares debido a la geometría angular que presenta. (FELÉZ Marta.; 2009 p 13) (Carbajal, A.; Gonzales, M., 2012,p. 63)

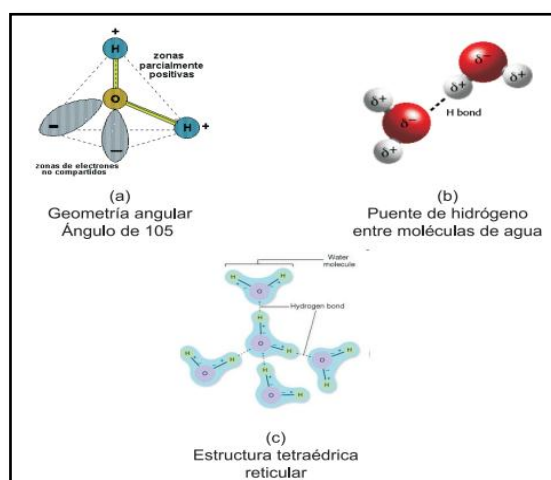


Figura 1-1: Estructura molecular del agua

Fuente: Carvajal, A. & Gonzales M. 2012

1.1.1 Propiedades físicas y químicas del agua

Las propiedades que presenta el agua están directamente relacionadas con las condiciones estéticas y de aceptabilidad. Las propiedades más importantes del agua son las que se mencionan a continuación:

Turbidez: La turbidez se produce por la suspensión de partículas en el agua, estas partículas pueden ser de limo, arcilla, tierra, etc., las mismas forman el sistema coloidal que según su tamaño se suspenden en el agua reduciendo su transparencia en menor o mayor grado afectando la calidad estética del agua y ocasionando el rechazo de los consumidores (Barrenechea, Ada 2004, p 9)

Color: El color del agua puede o no estar relacionado con la turbidez que presente, esta característica puede ser atribuida a la presencia de ácidos húmicos, ácidos grasos, taninos, ligninas etc., además intervienen parámetros como la temperatura, el pH, la solubilidad de los compuestos coloreados y el tiempo de contacto. (Barrenechea, Ada 2004, pp 9-10)

Olor y sabor.- Estas características son muy importantes ya que de ellas depende la aceptación o rechazo del agua por parte del consumidor (Tabla 1-1). La falta de olor puede indicar la ausencia de contaminantes, caso contrario si existe la presencia de olor a sulfuro de hidrógeno indica una acción séptica de compuestos orgánicos e inorgánicos en el agua. (Barrenechea, Ada 2004, p 10)

Tabla 1-1. Olores característicos del agua y su origen

Naturaleza	Origen
Olor balsámico	Flores
Dulzor	Coelosphaerium
Olor químico	Aguas residuales industriales
Olor a cloro	Cloro libre
Olor a hidrocarburo	Refinería de petróleo
Olor medicamentoso	Fenol, yodoformo
Olor a azufre	Ácido sulfhídrico, H ₂ S

Olor séptico	Alcantarilla
Olor fecaloide	Retrete, alcantarilla

Fuente: BARRENECHEA, Ada 2004, p 10

-Temperatura.- La temperatura es uno de los parámetros que influyen en la aceleración o retardo de la actividad biológica, la formación de depósitos, la absorción de oxígeno, los procesos de mezcla, la precipitación de compuestos. (Barrenechea, Ada 2004, p 13)

-pH.- El valor del pH del agua es un indicador que determina la acidez o no acidez (basicidad o alcalinidad) del agua. Está determinado por el número de iones libres de hidrógeno (H⁺) en una sustancia. La acidez es una de las propiedades más importantes del agua. El pH sirve como un indicador que compara algunos de los iones más solubles en agua. (Sánchez, J. 2010 pp.5-6; Marín R.; 2008 pp 6-7)

-Capacidad disolvente.- El agua es un disolvente de compuestos iónicos como de compuestos covalentes polares (glúcidos) y sales minerales, poseen moléculas bipolares debido a que tienen una elevada constante dieléctrica, tienen la capacidad de formar puentes de hidrógeno con otras sustancias ya que se disuelven cuando reaccionan con moléculas polares del agua lo cual permite solubilizar un compuesto. (Concha, L. 2008 p. 4)

Gracias a que el agua tiene la capacidad disolvente puede cumplir importantes funciones para los seres vivos ya que en este medio se producen las reacciones del metabolismo, aporte de nutrientes, y eliminación de desechos. La capacidad de disolución de agua aumenta a medida que la temperatura aumente. (Concha, L. 2008 p. 4)

1.2. Aguas minerales

Las aguas minerales son aguas naturales que poseen una temperatura, caudal, composición química y bacteriológica invariable, obtenidas de fuentes naturales de aguas subterráneas. Se originan en estratos acuíferos profundos. La norma de agua mineral (NC 93-01-218: 1995) establece que en

ellas no debe existir la presencia de gérmenes patógenos y que deben poseer más de 1g de minerales disueltos por Kg de agua. (Fagundo J et al. 2004 p. 1)

La Organización Mundial de la Salud OMS en 1969 define como aguas minerales, a las aguas que no presenta contaminación bacteriológica procedente de fuentes subterráneas que poseen 1 g de minerales por Kg de agua o 250 mg de CO₂ libre y según criterios del comité Coordinador de la FAO/OMS 1985 tienen propiedades favorables para la salud. (Fagundo J et al. 2004 p. 1)

1.2.1. Tipos de aguas minerales

El agua mineral natural.- Se obtiene de fuentes naturales de agua subterránea que proceden de acuíferos protegidos de contaminación, se caracteriza principalmente por su naturaleza, minerales, oligoelementos y pureza natural. (INEN, 2011, p.8)

-Agua mineral natural carbonatada. Es un agua mineral natural que contiene gas carbónico proveniente de la fuente. (INEN, 2011, p.8)

-Agua mineral natural no carbonatada. Es aquella agua mineral natural que no posee gas carbónico en su composición. (INEN, 2011, p.8)

-Agua mineral natural reforzada con gas de la fuente es un agua mineral natural efervescente cuyo contenido de gas carbónico proviene de la fuente. (INEN, 2011, p.8)

-Agua mineral natural con adición de gas carbónico. Es un agua mineral natural que se le adiciona gas carbónico mediante un determinado tratamiento. (INEN, 2011, p.8)

-Agua mineral natural descarbonatada. Es un agua mineral natural a la cual se le ha sometido a tratamiento para eliminar el gas carbónico que proviene de la fuente. (INEN, 2011, p.8)

1.2.2. Clasificación de las aguas minerales

Las aguas minerales pueden ser clasificadas de acuerdo a ciertos parámetros entre los que podemos citar:

1.2.2.1. La temperatura

Según Ergorov y Luge en 1967 la temperatura que presentan las aguas subterráneas depende principalmente de las condiciones climáticas y geotérmicas de la región. (Fagundo J et al. 2004 p.7). De acuerdo a la temperatura (Tabla 1-2) que posean en el sitio de surgencia, se pueden clasificar en:

Tabla 1-2: Clasificación dependiendo de la temperatura del agua

Frias: si poseen menos de 20 °C
Hipotermiales: cuando su temperatura está entre 20 - 35 °C
Mesotermiales: si se encuentran entre 35-50 °C
Hipertermiales: si poseen entre 50 -100 °C

Fuente: (Armijo & San Martin 1994)

1.2.2.2. La Tonicidad

La tonicidad está relacionada con la cantidad de iones disueltos, según Karacolev (Tabla 1-3) la mineralización de 13 g/L alcanza el estado isotónico, la mayoría de aguas minerales son hipotónicas. (Fagundo J et al. 2004 p. 7)

Tabla 1-3: Clasificación dependiendo de su tonicidad.

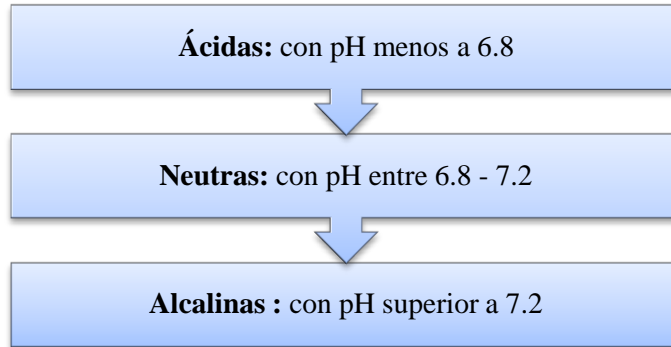
Hipotónicas: concentraciones < a 300 mmol/L
Isotónicas: concentraciones = a 300 mmol/L
Hipertónicas: concentraciones > a 300 mmol/L

Fuente: Karacolev 1987

1.2.2.3. Dependiendo del pH

Según la Norma Cubana de agua mineral, las aguas se clasifican en ácidas, neutras y alcalinas como se muestra en la (Tabla 1-4)

Tabla 1-4: Clasificación dependiendo de su pH.



Fuente: (Fagundo J et al. 2004 p. 7)

1.2.2.4. Dependiendo de los valores de residuos secos.

Las aguas termales de acuerdo a la cantidad de sólidos disueltos que poseen se clasifican como se muestra en la tabla 1-5.

Tabla 1-5: Clasificación dependiendo de los valores de residuos secos

Clasificación	Valores de RS
Oligometálicos	No superior a 100mg/L
De mineralización muy débil	Entre 100 y 250mg/L
De mineralización débil	Entre 250 y 500 mg/L
De mineralización media	Entre 500y 1000mg/L
De mineralización	Superior a 1000mg/L

Fuente: (MARAVÉR, F et al., 2003. P.16)

1.2.2.5. *Dependiendo de los valores de Salinidad.*

La salinidad es una propiedad importante de aguas termales y de aguas naturales. Este parámetro se da como una medida de la cantidad total de sales disueltas en un volumen determinado de agua. La clasificación se muestra en la tabla 1-6.

Tabla 1-6: Clasificación Dependiendo de los valores de Salinidad.

Clasificación	Valores de STD
Baja salinidad	(STD = 0 a 160mg/mL)
Salinidad media	(STD = 160 a 480mg/mL)
Salinidad alta	(STD = 480 a 1440mg/mL)

Fuente: BURBANO, Napoleón., et al. 2013. p. 13

1.2.2.6. *Dependiendo de su composición químico - física.*

Cuando las aguas termales superan el gramo por litro de mineralización global se clasifican tomando en cuenta su contenido aniónico y catiónico predominante en: bicarbonatadas, cloruradas, sulfatadas, sódicas, cálcicas o magnésicas siempre que el ión correspondiente sea mayor al 20% del contenido aniónico o catiónico expresado en equivalentes como se muestra en la tabla 1-7; si no superan el gramo por litro de mineralización global solamente se indica cuál es el ión que predomina. (Fagundo J. 1996)

Tabla 1-7: Clasificación dependiendo de su composición química-física

Con relación a los aniones	Con relación a los cationes
Aguas bicarbonatadas	Aguas cálcicas
Aguas Sulfuradas	Aguas magnésicas
Aguas Cloruradas	Aguas sódicas
Aguas bicarbonatadas sulfuradas	Aguas cálcico magnesianas
Aguas bicarbonatadas cloruradas	Aguas cálcico sódicas
Aguas Sulfatocloruradas	Aguas magnésico sódicas
Aguas Sulfatocloruradas bicarbonatadas	Aguas cálcico-magnésico sódicas

Fuente: Fagundo J. 1996

1.2.2.7. Dependiendo de su origen

Gautier Clasifica las aguas dependiendo de su origen en superficiales y profundas

Las aguas superficiales son de origen meteórico o marino, las cuales penetran el suelo llegando a capas que son impermeables, las mismas se acumulan de mayor a menor volumen y salen hacia el exterior aprovechando las grietas que existen entre las rocas. El agua cuando se dirige hacia el exterior va captando minerales por disolución o incorporación de las distintas capas de terreno

.

Las aguas profundas son aquellas de origen magmático o volcánico, caracterizadas por la presencia de elementos (minerales) asociados a su origen. (Fagundo J et al. 2004 p. 4)

Armijo y San Martín en 1994 clasificó las aguas subterráneas de la siguiente manera:

-Agua meteórica.- Aquella agua que recientemente forma parte del ciclo hidrológico.

-Agua congénita.- Aquella agua que durante largos periodos de tiempo ha estado fuera de contacto con la atmósfera.

-Agua metamórfica.- Aquella agua que durante su metamorfosis ha permanecido en contacto con rocas.

.Agua magmática.- Aquella agua que se ha originado en el interior de los magmas de poca profundidad.

-Agua plutónica.- Aquella agua que se ha originado a grandes profundidades en el interior de los magmas. (Fagundo J et al. 2004 pp. 4-5)

1.2.3. Aguas Mineromedicinales

Las aguas mineromedicinales son aquellas que por su composición y características pueden presentar acciones terapéuticas. Sus propiedades curativas han sido demostradas por diferentes tipos de aguas existentes, por ensayos clínicos o de la experiencia médica comprobada, además de conservar sus propiedades beneficiosas para la salud aun después de ser envasadas. No todas las aguas mineromedicinales son termales ya que existen aguas mineromedicinales frías. (Fagundo J et al. 2004 p. 4) (Balnearios.com 2006 p.11)

1.3. Aguas termales

Se consideran aguas termales a aquellas aguas subterráneas que en el punto donde emergen poseen una temperatura al menos 5 °C sobre la temperatura ambiente. Estas aguas emanan de capas subterráneas ricas en minerales. (Fagundo J et al. 2004 pp. 6) (Acosta, et, al., 2016)

1.3.1. Origen de las aguas termales

Las aguas termales pueden proceder de origen meteórico. Las aguas meteóricas son las que se infiltran en el suelo y descienden hasta llegar a capas profundas las cuales elevan su temperatura, ascienden hacia la superficie a través de fisuras presentes en las rocas. (Pinuaga, J. 2002 pp. 4-5)

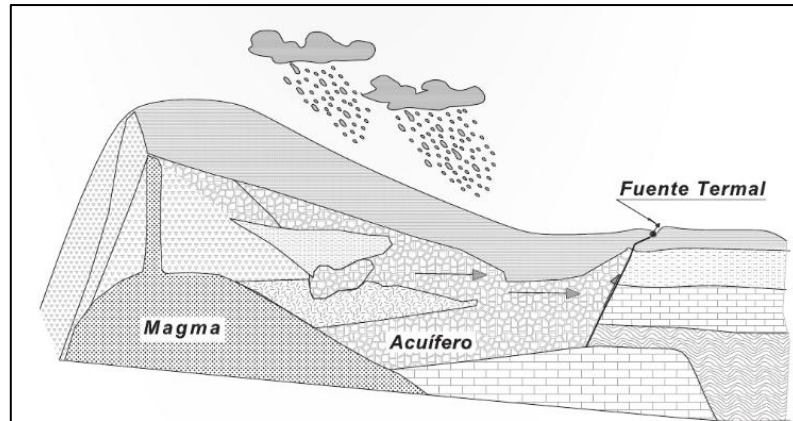


Figura 1-2: Origen de las aguas termominerales

Fuente: BurbanoI, 2012

Los suelos de donde provienen las aguas termales son los responsables de darles las características físico-químicas a las aguas, debido a esto existe variación de su temperatura, el contenido de sales y las características hidrológicas. (Pinuaga, J. 2002 pp. 4-5)

En algunos casos, la circulación de las aguas de origen meteórico permite explicar las características físico-químicas de las aguas termales dándoles un origen magmático, volcánico y químico.

Las aguas de origen magmático son primitivas pueden contener constituyentes volátiles compuestas de hidrogeno junto con elementos como boro, carbono, fosforo, azufre y cloro debido a la cristalización de los magmas. Estas surgen de la relación con filones metálicos o eruptivos. (Termas de Reyes, 2010 p 1)

1.3.2. Beneficios de las aguas termales

Los beneficios que se obtiene al usar las aguas termales no dependen directamente del agua, sino de estímulos físicos y químicos. Los efectos químicos están dados por los componentes que se encuentran en el agua ya que al estar en contacto con la piel pasan por osmosis al torrente sanguíneo. (Termas de Reyes, 2010 p 1)

Los efectos físicos de las aguas termales están relacionados con la temperatura que tiene el agua, esta produce vaso dilatación periférica la cual mejora la oxigenación de los tejidos produciendo el aumento del metabolismo y estimulando la secreción del tracto digestivo, también liberan sustancias que presentan efectos antiinflamatorios, relajantes musculares produciendo una sensación de bienestar, además la temperatura ayuda a eliminar toxinas del cuerpo. (Termas de Reyes, 2010 p 1) (Méndez, Avilio. 2010)

El uso de las aguas termales de manera frecuente, normaliza las funciones del sistema nervioso y de las glándulas endocrinas, estimula el sistema inmune, produce endorfinas y regula las funciones glandulares. (Termas de Reyes, 2010 p 1) (Méndez, Avilio. 2010)

Las aguas termales ayudan en las enfermedades de la piel (hongos, dermatitis, psoriasis), ayuda a curar lesiones y en algunos casos también las heridas. Se ha descrito que las sulfobacterias ayudan a que el cuerpo mejore sus defensas frente a agresiones que se presenten en la piel además disminuye su envejecimiento. (Mendez, Avilio. 2010)

Otros beneficios que brindan las aguas termales son los siguientes:

- Alivia dolores reumáticos
- Posee un poder analgésico y calma los dolores
- Su acción resolutive y revulsiva, hace que actúe sobre los edemas, procesos crónicos fibrosos y tumefacciones.
- Es un relajante y sedante excelente para el estrés (Mendez, Avilio. 2010)

1.4. Controles de calidad de las aguas termales

Todas las aguas minero medicinales tienen características químicas, físicas y microbiológicas propias que les confieren una especificidad que determina sus propiedades y aplicaciones, pero existen factores que podrían condicionar sus propiedades.

Las siguientes son algunas de las causas que podrían alterar las características de las aguas minero-medicinales:

- Caudal: se refiere a la cantidad de agua que sale por la vertiente. Algunas causas naturales que pueden alterar su estabilidad son los sismos y la acumulación de sedimentos en la vía de emergencia del agua que podrían ser por hidróxido férrico o carbonato de calcio. Otras causas podrían deberse a la realización de obras públicas cerca del lugar como zanjas de gran tamaño para conducciones o canales. (Rodés, Benito., 2010 pp.76-77)

Es necesaria la realización de controles periódicos del caudal ya que los factores mencionados pueden alterar la cantidad de agua lo que podría provocar la interrupción brusca del caudal hasta llegar a su agotamiento total. (Rodés, Benito., 2010 pp.76-77)

- Temperatura.- la temperatura que presenta el agua está estrechamente relacionada con la profundidad de su origen, y así se puede hablar de gradiente geotérmico observándose un incremento de 3°C por cada 100 metros de profundidad. Sin embargo no siempre la temperatura se mantiene constante, existe variaciones como las producidas por la mezcla con aguas de precipitación infiltradas, por lo cual es recomendable la realización de mediciones periódicas que detecten la presencia de algún fenómeno anómalo y las posibles causas. (Rodés, Benito., 2010 pp.77-78)
- Oligoelementos.- Se encuentran en las aguas minero-medicinales de forma iónica y en una concentración menor a 1 mg/L. Desarrollan funciones importantes en el organismos llegando a ser alguno de ellos beneficiosos e imprescindibles para la salud o pueden producir efectos tóxicos, (Rodés, Benito., 2010 pp.76-77)

1.5. Contaminación del agua

Se dice que el agua presenta contaminación cuando en ella se encuentra sustancias ajenas alterando su composición normal. Los contaminantes son agentes físicos como árboles, animales, suelo entre otros, agentes químicos como residuos industriales, sustancias orgánicas, metales pesados que son

arrojados al agua y agentes biológicos como bacterias o microorganismos que viven en el agua. (Concha 2008 p. 15)

La contaminación del agua en las piscinas puede deberse a la falta de higiene de los usuarios, deficiencia de limpieza y mantenimiento de las instalaciones o del propio usuario ya que no toma medidas sanitarias básicas al momento de ingresar a la piscina y deposita en cantidades considerables gérmenes patógenos de origen cutáneo, digestivo, faríngeo y genito urinario, los cuales al ser transmitidos a otros usuarios pueden provocar enfermedades (Concha 2008 p. 16)

En ocasiones las aguas de las piscinas presentan condiciones favorables para el desarrollo de microorganismos, si las condiciones son favorables el microorganismo vive el tiempo suficiente para provocar algunas enfermedades. Las infecciones micóticas son comunes ya que estos lugares presentan condiciones de temperatura y humedad favorables para que los microorganismo se desarrollen. (Concha 2008 p. 16)

Entre las bacterias que ocasionan la contaminación del agua minero-medicinal podemos mencionar a los coliformes, estreptococos, clostridios, *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Pseudomonas aeruginosa* entre otras, las cuales generan un grave riesgo sanitario. (Ródes B, 2010, p. 80)

En la tabla 1-8 podemos ver las patologías y sintomatología que presentan ciertas bacterias contaminantes del agua

Tabla 1-8: Enfermedades por patógenos contaminantes del agua

Microorganismo	Enfermedad	Síntomas
Bacteria	Cólera	Diarreas y vómitos intensos. Deshidratación. Frecuentemente es mortal si no se trata adecuadamente
Bacteria	Tufus	Fiebres. Diarreas y vómitos. Inflamación del bazo y del intestino.
Bacteria	Disentería	Diarrea. Raramente es mortal en adultos, pero produce la muerte de muchos niños en países poco desarrollados
Bacteria	Gastroenteritis	Náuseas y vómitos. Dolor en el digestivo. Poco riesgo de muerte

Virus	Hepatitis	Inflamación del hígado e ictericia. Puede causar daños permanentes en el hígado
Virus	Poliomelitis	Dolores musculares intensos. Debilidad. Temblores. Parálisis. Puede ser mortal
Protozoos	Disentería amebiana	Diarrea severa, escalofríos y fiebre. Puede ser grave si no se trata
Gusanos	Esquistosomiasis	Anemia y fatiga continuas

Fuente: García G, 2002, p. 5

1.5.1. Contaminantes del agua

- Microorganismos patógenos.- Como bacterias, virus, protozoos y otros organismos causan enfermedades. Llegan al agua por medio de las heces o por restos orgánicos. (Tabla 1-8)
- Desechos orgánicos.- Residuos producidos por los seres vivos, descompuestos por bacterias aerobias.
- Sustancias químicas inorgánicas: sustancias principalmente metales pesados, se encuentran en cantidades elevadas y pueden ser dañinos para la salud de los seres vivos, como por ejemplo ácidos y sales.
- Nutrientes vegetales inorgánicos. Son principalmente sustancias que provocan el crecimiento desmesurado de algas y otros organismos.
- Sedimentos y materiales suspendidos. Partículas provenientes del suelo que llegan al agua, son la mayor fuente de contaminación. (García G, 2002, p. 2)

1.6. Microbiología

La microbiología es la ciencia que se encarga del estudio de los organismos cuyo tamaño es muy pequeño como para ser visibles a simple vista, es decir son visibles únicamente en el microscopio. (Ródes B, 2010, p. 80) (Scribd, 2010, p1)

1.6.1. Microorganismos

Los microorganismos son organismos vivos que no pueden observarse a simple vista, ellos pueden formar parte de procariotas, células sin núcleo como las bacterias y células eucariotas con núcleo como los hongos y levaduras. (Scribd, 2010, p. 1)

1.6.2. Morfología bacteriana

Las bacterias son células procariotas que se reproducen por fisión binaria, poseen el material genético y mecanismos productores de energía necesarios para su crecimiento y desarrollo. (Pirez, M. & Mota, M 2008)

Las bacterias poseen un tamaño que oscila entre las 0.5 y 3 μm , y en algunos casos el tamaño alcanza los 10 μm Las bacterias de interés médico tienen un tamaño entre 0.4 y 2 μm , por ende son únicamente visibles al microscopio óptico o electrónico. Existen ligeras variaciones de tamaño de las células bacterianas siendo mayor la diferencia entre las formas bacilares que entre las formas esféricas. (Pirez, M. & Mota, M 2008) (Díaz G, 2009)

La morfología bacteriana se considera desde dos puntos de vista:

- 1) Como células individuales observables únicamente de forma microscópica.
- 2) Como colonias apreciables a simple vista después de desarrollarse en la superficie de medios de cultivo.

1.6.2.1. Morfología microscópica

La diferencia más importante entre las bacterias es su forma, existiendo tres tipos de morfología.

- ✓ Formas esféricas o cocos. Son bacterias esféricas y homogéneas presentan un tamaño, de 0,6 a 1,0 μm (Fig.1-3) presentan formas variadas como lanceoladas, formas en grano de café, forma

achatada o denominada también coco bacilar. Cuando los cocos aparecen de forma individual se les llama coco, si aparecen en pares, se los llama diplococos, si se agrupan en cadena se los llama estreptococos y si se agrupan en racimos se los denomina estafilococos. (Díaz G, 2009)

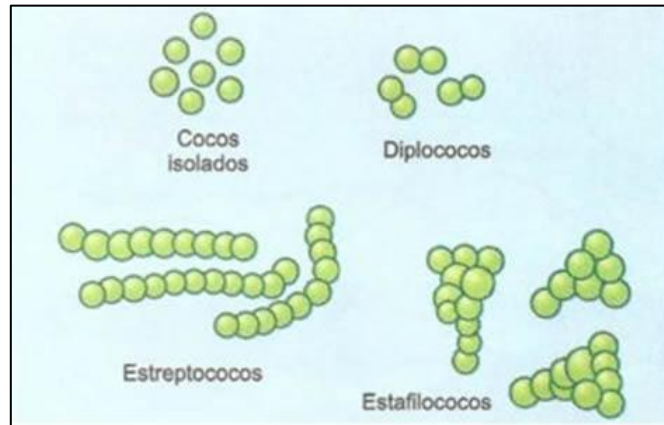


Figura 1-3: Disposición de los cocos bacterianos

Fuente: Gavetasdemiescritorio. 2013

- ✓ Formas alargadas o bacilos.- la diferencia que presentan en la forma de los extremos, longitud y ancho de la célula proporciona una considerable heterogeneidad a la forma bacilar. (Fig.1-4) Presentan forma recta o en forma de bastones rectos o curvos. (Díaz G, 2009)

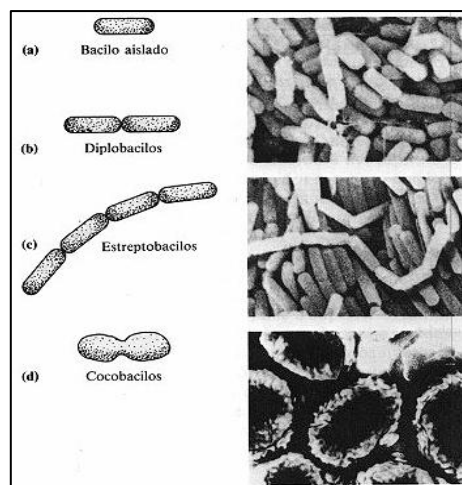


Figura 1-4: Disposición de los bacilos

Fuente: Aulavirtual, 2002

- ✓ Formas curvadas, comas o espirilos.- Se los puede considerar como bacilos que se han torcido hasta adaptarse a la forma de hélice, pueden ser alargados y delgados, la espira puede ser rígida o flexible, y se desplazan con movimientos de sacacorchos. (Fig.1-5) Cuando posee espirilares flexibles se le conoce como espiroquetas. Para reconocer las espiroquetas patógenas se toma en cuenta la morfología con parámetros como el tamaño de vuelta, el ángulo en los extremos y la composición del filamento axial. (Díaz G, 2009)

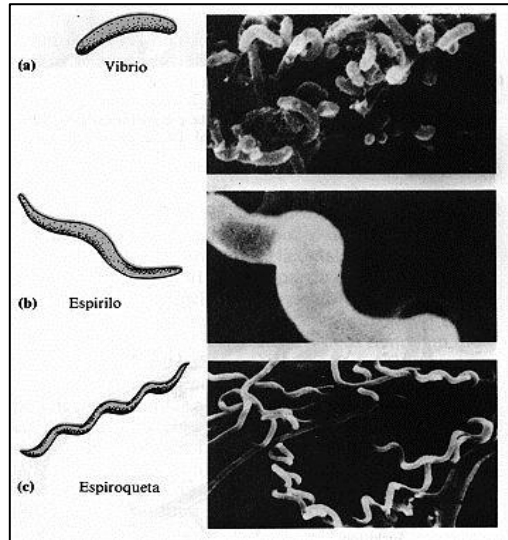


Figura 1-5: Vibrio, Espirilo, Espiroqueta

Fuente: Aulavirtual, 2002

1.6.3. Análisis microbiológico de las aguas termales

La población microbiológica presente en las aguas minero-medicinales está relacionada con las características de las mismas, como los nutrientes, la temperatura, pH que presenta etc. (Ródes B, 2010, p. 80) (Scribd, 2010, p1)

Los microorganismos indicadores, son aquellos que permiten evaluar la calidad del agua ya que muestran la presencia de microorganismos que pueden afectar las condiciones del medio produciendo alteraciones en el mismo pudiendo poner en riesgo la salud de los usuarios. (Tejedor, R. 3013. p.3)

La presencia de bacterias heterotróficas constituyen un grupo de bacterias ampliamente distribuidas en el ambiente, las mismas indican la eficacia de los procesos de tratamiento y desinfección.

Los coliformes incluyen los géneros *Escherichia*, *Klebsella*, *Enterobacter*, *Serratia* y *Citrobacter* los cuales se encuentran distribuidos en el ambiente, no se asocian con contaminación fecal y no presentan un riesgo para la salud exceptuando la *Escherichia*. Cuando las condiciones son favorables las especies de *Enterobacter* y *Klebsiella* crecen en el interior de las cañerías, tanques de almacenamiento formando una biopelícula. (Marchand Edgar, 2002)

1.6.3.1 Aerobios mesófilos

Son microorganismos que se desarrollan a una temperatura de 20 a 45°C en presencia de oxígeno y son capaces de crecer en agar nutritivo. (Herrera, S. 2013)

1.6.3.2. Coliformes fecales

Los coliformes fecales fermentan la lactosa a 44.5°C, están presentes en las heces fecales de animales de sangre caliente y casi el 95% corresponden a los géneros *Escherichia* y *Klebsella*, algunos coliformes tienen la capacidad de multiplicarse en el agua y de resistir altas temperaturas, esta característica permite diferenciarlos de los coliformes totales. (CYTED, 2003 p. 2-3)

1.6.3.3. Coliformes totales

Los coliformes totales son bacilos Gram negativos aerobios y anaerobios facultativos, tienen la capacidad de fermentar lactosa con producción de gas y ácido en un tiempo de 48 horas y a una temperatura de 30-37 °C., pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* y se encuentran en el intestino del hombre y de los animales, pueden aparecer también en otros ambientes como el suelo, agua, plantas, etc. (CYTED, 2003 p. 2-3)

1.6.3.4. Staphylococcus aureus

Los *Staphylococcus aureus* son cocos Gram positivos que miden aproximadamente 0,5 a 1.5 μm de diámetro, se agrupan en tétradas, cadenas racimos o pares. Son bacterias no móviles no esporuladas, no poseen capsula y son anaerobias facultativas, producen catalasa, que es una característica que ayuda a diferenciar a los *Staphylococcus* de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus* ya que son catalasa negativos. (Salazar. P. 2014 pp. 28,30)

El *Staphylococcus aureus* es considerado uno de los patógenos más virulentos causante de múltiples infecciones y enfermedades que van desde infecciones de la piel hasta infecciones graves que podrían poner en riesgo la vida del ser humano. (Salazar. P. 2014 pp. 28,30)

1.6.3.5. Mohos y levaduras

Los hongos abarcan los mohos y las levaduras, son organismos eucarióticos unicelulares o filamentosos, su pared celular contiene quitina y β - glucanos. Su reproducción es de forma asexual y sexual. (Cano, S. 2006 p.15)

1.6.4. Microorganismos presentes en las aguas minerales termales

Las aguas minero-medicinales poseen una gran diversidad de microorganismos autóctonos y alóctonos.

Los microorganismos autóctonos son característicos de cada tipo de agua y su presencia está estrechamente relacionada con sus propiedades fisicoquímicas (temperatura, composición química y pH). Los microorganismos alóctonos son considerados como contaminantes ya que provienen de otros hábitats, pero es inusual encontrar bacterias patógenas e indicadores fecales. (DE LA ROSA, Ma del Carmen & MOSSO Ma de los Angeles 2000, p.153)

En las aguas de los balnearios hipertermales predominan las bacterias Gram positivas, mientras que en las aguas mesotermas predominan los bacilos Gram negativos y cocos Gram positivos. (DE LA ROSA, Ma del Carmen & MOSSO Ma de los Angeles 2000, pp.153-155)

1.6.4.1. Microorganismos autóctonos

Los microorganismos autóctonos de las aguas termales se desarrollan mejor en medios de cultivo con pocas cantidades de carbono y después de un tiempo largo de incubación, algunas bacterias son termófilas por lo que se desarrollan a una temperatura superior a 45°C pero la mayoría son mesófilas las cuales se desarrollan a 37°C y se han adaptado a crecer en temperaturas elevadas. (De La Rosa y Mosso, 2000, p.155)

Las bacterias que predominan en los manantiales termales son las heterótroficas ya que necesitan escasos requerimientos de carbono y nitrógeno y en menor proporción los microorganismos autótrofos como las cianobacterias y bacterias verdes y rojas, la mayoría son aerobios y anaerobios facultativos. (DE LA ROSA, Ma del Carmen & MOSSO Ma de los Angeles 2000, p.154)

Las bacterias que se encuentran en las aguas sulfurosas (por ejemplo *Beggiatoa*, *Thermothrix*, *Thiobacillus*) son capaces de oxidar el azufre y el sulfhídrico, las bacterias sulfatorreductoras son consideradas peligrosas debido a la producción de sulfhídrico. (*Desulfotomaculum*, *Desulfovibrio*). Las bacterias están presentes en aguas cloruradas e hipercloruradas moderadas y halotolerantes ya que poseen un mecanismo de regulación interna que les permite resistir una elevada osmolaridad. (DE LA ROSA, Ma del Carmen & MOSSO Ma de los Angeles 2000, p.154)

Las bacterias Gram negativas y los cocos Gram positivos están presentes en aguas mesotermas, mientras que en las hipertermales predominan las bacterias Gram positivas, dicha diferencia puede deberse a la temperatura ya que las bacterias Gram positivas son más resistentes al calor. Los principales géneros identificados en los manantiales termales son *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Enterobacter*, *Acinetobacter* y *Arthrobacter* (Mosso et al. 1994).

1.6.4.2. Microorganismos alóctonos

En las aguas termales no debe existir la presencia de indicadores fecales ni bacterias patógenas, sin embargo se ha encontrado en manantiales la presencia de *coliformes*, *enterococos*, *Clostridium* sulfito reductores y *Pseudomonas*. Desde un punto de vista sanitario esto no representa un riesgo ya que los microorganismos pueden provenir del suelo o de la vegetación ya que tienen la facilidad de adaptarse a ambientes acuáticos. (De la, Ma del Carmen & Mosso Ma de los Angeles 2000, pp.156)

Sin embargo la *P. aeruginosa* es un patógeno oportunista que puede provocar infecciones en personas inmunodeprimidas por lo que su presencia no es deseable. En cuanto a las algas, hongos y mohos de los géneros: *Penicillium*, *Aspergillus* y *Alternaria*, se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y su presencia en cantidades bajas no representa un riesgo sanitario. (De la, Ma del Carmen & Mosso Ma de los Angeles 2000, pp.156)

1.7. Recuento e Identificación microbiana

El recuento en placa es el método más usado y el que nos permite determinar el número de unidades formadoras de colonia o células viables existentes en la placa. Este método se basa en la inoculación de la placa con una cantidad determinada de muestra, incubación a una temperatura y tiempo determinado y posteriormente se realizará el conteo de las colonias que se desarrollaron en la placa. (Analiza, calidad. 2010, p. 2)

El método de recuento en placa no se considera como recuento total ya que solo se realiza el conteo de aquellos microorganismos que son capaces de crecer en determinadas condiciones la temperatura, la composición del medio, la atmósfera y el tiempo de incubación. (Analiza, calidad. 2010, p. 2)

1.7.1 Placas Petrifilm

Las Placas Petrifilm™ (Figura 1-6) son medios de cultivo listos para ser empleados, están reconocidos por la AOAC™ (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS) INTERNATIONAL como Métodos Oficiales de Análisis, contiene, un agente gelificante soluble en agua fría, nutrientes del Agar Standard Methods y un tinte indicador que permite el recuento de las colonias. Las placas Petrifilm son fáciles de usar, permiten el ahorro de tiempo y son menores sus costes de operación. (3M., 2004)



Figura 1-6: Placas Petrifilm 3M

Fuente: (3M., 2004)

1.7.2. Medios de Cultivo

Un medio de cultivo es una mezcla equilibrada de nutrientes que permite en condiciones físicas óptimas, el desarrollo de microorganismos. Este se presenta desecado en forma de polvo y una vez preparado puede encontrarse en estado sólido, líquido o semisólido. (EcuRed, 2017)

Un medio de cultivo debe tener los nutrientes y factores de crecimiento necesarios y debe estar protegido de todo microorganismo que pueda contaminarlo. Muchas bacterias para su crecimiento en el medio de cultivo requieren de factores extras de crecimiento como sangre, suero y extracto de levadura entre otros. (López, L & Torres C., 2006 pp. 1-3) (EcuRed, 2017)

Para un crecimiento óptimo de las bacterias, el medio de cultivo debe reunir ciertas condiciones como un grado correcto de acidez y alcalinidad, temperatura, grado de humedad y presión de oxígeno adecuadas. (Fig.1-7) (EcuRed, 2017)



Figura 1-7: Medios de Cultivo

Fuente: Microbiología, 2014

1.7.3. Clasificación de los medios de cultivo

Los medios de cultivo pueden clasificarse según su origen, consistencia y composición:

Según su origen:

- **NATURALES:** se preparan a partir de sustancias naturales de origen animal o vegetal (extractos de tejidos o infusiones) (López, L & Torres C., 2006 pp. 1-3)

- **SINTÉTICOS:** poseen componentes de alta pureza debido a esto se conoce su composición química, cualitativa y cuantitativamente. Se utilizan para obtener resultados reproducibles. (López, L & Torres C., 2006 pp. 1-3)
- **SEMISINTÉTICOS** son medios de cultivo sintéticos que se les añaden factores de crecimiento, como por ejemplo extracto de levadura. (López, L & Torres C., 2006 pp. 1-3)

Según la consistencia.

- **LÍQUIDOS:** medios de cultivo que se los denomina caldos poseen nutrientes en solución acuosa. (López, L & Torres C., 2006 pp. 1-3)
- **SÓLIDOS:** poseen una sustancia de sostén que es el Agar-Agar, esta sustancia no es digerida por las bacterias no constituye el elemento nutritivo. Permite observar la formación de colonias en la superficie del medio de cultivo y observar también su morfología. (López, L & Torres C., 2006 pp. 1-3) (Wikilibros, 2016)
- **SEMISÓLIDOS:** este medio se usa para determinar la motilidad que presentan los microorganismos en estudio. Contienen menor cantidad de agar en su composición por lo que no solidifica totalmente a temperatura ambiente. (López, L & Torres C., 2006 pp. 1-3) (Wikilibros, 2016)

Según la composición

- **Medios nutritivos:** en este medio se da el crecimiento de microorganismos que no necesitan requerimientos especiales, es un medio que pocos componentes. (Quistián H. 2014)
- **Medios de enriquecimiento:** se utiliza para el desarrollo de microorganismos exigentes, ya que contienen factores indispensables como la adición de sangre u otros productos biológicos un ejemplo de este tipo es el Agar Chocolate. (Quistián H. 2014)
- **Medios selectivos:** son medios de cultivo que permite el crecimiento de microorganismos específicos, un ejemplo de estos medios es el Caldo Selenito. (Quistián H. 2014)

- Medios inhibidores: Medio de cultivos que inhibe el crecimiento de ciertos microorganismos debido a las sustancias añadidas en su composición, un ejemplo de este tipo de medios es el Mac-Conkey. (Quistián H. 2014)
- Medios diferenciales: Son medios de cultivo que se utilizan para diferenciar géneros o especies debido a características bioquímicas poseen. (Quistián H. 2014)
- Medios de identificación: Permite determinar alguna cualidad específica que nos ayude a reconocer la identidad del microorganismo, un ejemplo de estos medios es el Agar Kligler y el Simmons.
- Medios de transporte: estos medios son útiles para asegurar la viabilidad de la bacteria desde el momento de su extracción hasta su posterior estudio. (López, L & Torres C., 2006 pp. 1-3)

Entre los medios de cultivo más utilizados para realizar la caracterización química podemos mencionar los siguientes:

1.7.3.1. Agar Eosina Azul De Metileno (E.A.M.)

Este medio se usa para el aislamiento selectivo de bacilos Gram negativos de escasas exigencias nutricionales. Permite el desarrollo de todas las especies de la familia Enterobacteriaceae. (Britanualab, 2012)

Posee en su composición el indicador eosina azul de metileno la cual permite la diferenciación de los organismos capaces de utilizar lactosa y /o sacarosa de aquellos que no lo hacen ya que ejerce un efecto inhibitorio sobre las bacterias Gram positivas. Las colonias que presentan un centro oscuro y periferia azulada o rosada son aquellas que utilizan la lactosa. (Britanualab, 2012)



Figura 1-8: Agar E.A.M.

Fuente: BENAVIDES Cyntia, 2017

En la tabla 1-9 se detalla las diferentes coloraciones que presentan los microorganismos más representativos que crecen en agar Eosina Azul de metileno

Tabla 1-9: Coloración de algunas cepas de microorganismos en el medio EAM

Microorganismos	Tipo de Colonia
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Verdosas con brillo metálico y centro negro azulado
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	Mucosas, rosa púrpura, confluentes
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 43071	Incoloras
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Incoloras, pequeñas, puntiformes
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	Incoloras
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	Incoloras

Fuente: (Britanualab, 2012)

1.7.3.2. Agar Manitol Salado

Medio de cultivo selectivo y diferencial gracias a su alta concentración salina, y se utiliza para diferenciar estafilococos. Cuando alrededor de las colonias se presentan con una zona amarilla brillante (figura 1-9) es indicativo de que son estafilococos coagulasa positiva. Los estafilococos coagulasa negativa, presentan colonias rodeadas de una zona roja o púrpura. (Britanualab, 2012)

La fuente de carbono, nitrógeno, minerales y vitaminas la obtienen del extracto de carne y la pluripeptona, procedente del medio de cultivo, el indicador del medio de cultivo es el rojo fenol, el manitol es el hidrato de carbono fermentable, el cloruro de sodio inhibe el desarrollo de la flora acompañante. (Britanualab, 2012)

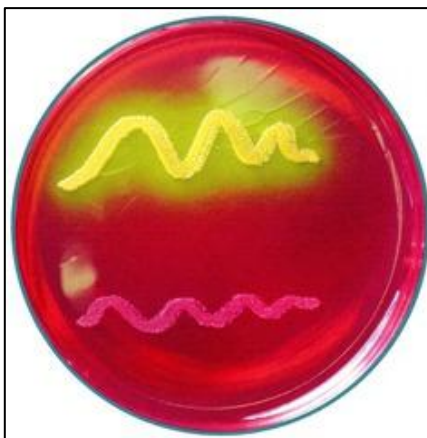


Figura 1-9: Agar Manitol Salado

Fuente: López, K., 2014

Tabla 1-10: Aspectos de crecimiento de microorganismos en Agar Manitol Salado.

Microorganismos	Crecimiento	Características de las colonias
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Excelente	Amarilla
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 14990	Bueno	Roja
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Inhibido	Inhibido
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	Inhibido	Inhibido

Fuente: (Britanualab, 2012)

1.7.3.3. Agar Mueller- Hinton

El Agar Mueller Hinton (figura 1-10) es el medio más utilizado para la realización de la prueba de sensibilidad a antibióticos. La composición que presenta este medio permite el crecimiento de

bacterias no exigentes (enterobacterias, enterococos, estafilococos y bacilos Gram-negativos no fermentadores). (Biomérieux, 2016).

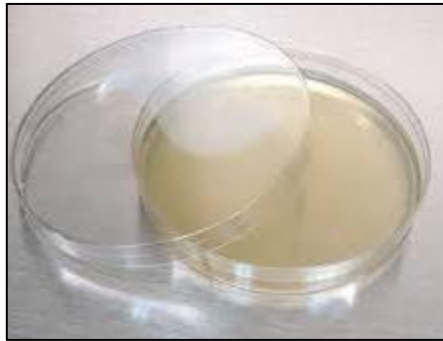


Figura 1-10: Agar Mueller- Hinton

Fuente: (Biomérieux, 2016)

1.7.3.4. Agar Sangre

Este medio se usa para el aislamiento y cultivo de microorganismos, gracias a la adición de sangre en concentración del 5%, el medio es útil para el aislamiento y cultivo de microorganismos aerobios y anaerobios nutricionalmente exigentes y permite detectar hemólisis. En la tabla 1-11 se muestran las características de los tipos de hemólisis en agar sangre (Britanialab, 2010)

Tabla 1-11: Hemólisis en Agar Sangre

Hemólisis	Halos
Alfa (α)	Halo color verdoso
Beta (β)	Halos incoloros
Gamma (γ)	No hay la presencia de halo

Fuente: Wikimedia, 2016

En la figura 1-11 se indica gráficamente como se ven los tipos de hemólisis en agar sangre

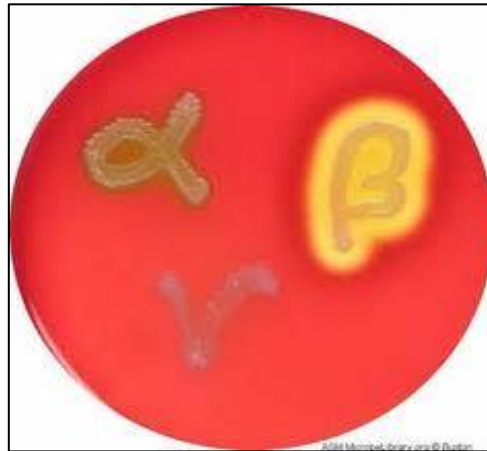


Figura 1-11: Hemólisis Alfa, Beta y Gamma

Fuente: (Wikimedia, 2016)

1.7.3.5. Agar MacConkey

Este medio se usa para el aislamiento de bacilos Gram negativos aerobios y anaerobios facultativos, diferencia bacterias que usan lactosa de las que no lo hacen. El hidrato de carbono fermentable es la lactosa, y las peptonas aportan os nutrientes para el desarrollo bacteriano. (Tabla 1-12). Las bacterias Gram negativas son inhibidas por la mezcla de sales biliares y el cristal violeta. El rojo neutro es el indicador de pH en el medio de cultivo. (Britanialab, 2010)

Tabla 1-12: Aspectos de crecimiento de microorganismos en Agar MacConkey

Microorganismos	Colonias
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Rojas con halo turbio
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	Rosadas mucosas
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	Incoloras, transparentes
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	Incoloras, transparentes
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 43071	Incoloras, transparentes
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Diminutas, incoloras, opacas

Fuente: Britanialab, 2010

1.7.3.6. Agar *Salmonella-Shigella*

Es un medio de cultivo selectivo y diferencial, la presencia de sales biliares y el verde brillante, hace al medio selectivo ya que inhiben el desarrollo de bacterias Gram positivas. Coliformes y el invasor de *Potus spp* y es diferencial ya que fermenta lactosa y se produce la formación de ácido sulfhídrico a partir del tiosulfato de sodio. Los microorganismos que fermentan la lactosa acidifican el medio haciendo virar al indicador de pH obteniéndose colonias rosadas o rojas sobre un fondo rojizo. (Tabla 13-1) (Britanialab, 2010)

Tabla 1-13: Aspectos de crecimiento de microorganismos en Agar *Salmonella Shigella*

Microorganismos	Colonias
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	Transparentes, centro negro
<i>Shigella flexneri</i>	Incoloras
<i>Shigella sonnei</i>	Incoloras
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 43071	Transparentes, centro negro
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Rosadas a rojas
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	Rosadas cremosas y mucosas
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Incoloras, de muy escaso crecimiento

Fuente: Britanialab, 2010

1.7.4.2. Tinción Gram

La tinción Gram es una coloración diferencial, su nombre se debe a Christian Gram quien la aplicó en 1884, es la más usada en bacteriología, emplea 4 reactivos químicos que son aplicados en un frotis de la muestra fijada al calor. En base a la respuesta que presenten las bacterias a la coloración, estas pueden dividirse en dos grupos Gram positivas y Gram negativas ya que se tiñen de distinta manera debido a diferencias constitutivas en la estructura de sus paredes celulares. (Madigan, 2004, p.58) (Prescott, 2004, p.29)

Según el comportamiento de las bacterias a la coloración se las puede clasificar en bacterias Gram positivas que toman un color azul violeta, mientras que las bacterias Gram negativas toman un color rosa o rojo. Como se ilustra en la figura 1-12. (Prescott, 2004, p.64)

Los colorantes usados en la tinción Gram son:

- Cristal violeta (colorante)
- Lugol (mordiente)
- Alcohol cetona (decolorante)
- Safranina (mordiente)

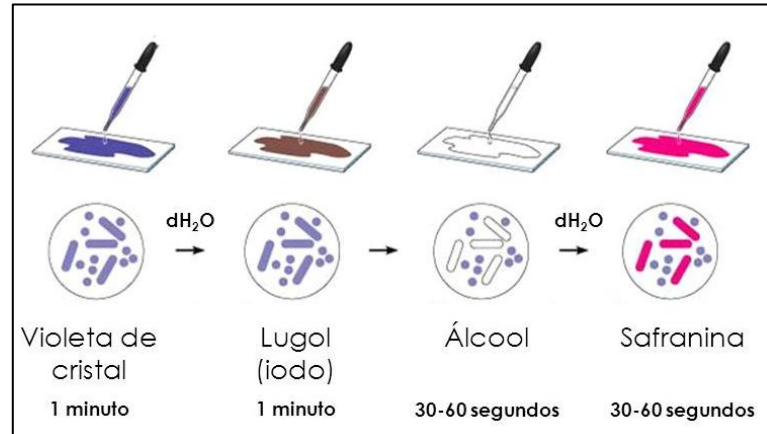


Figura 1-12 : Coloración Gram

Fuente: Seminario Tinciones, 2010

La diferencia de las bacterias se debe a la naturaleza física de la pared celular, las bacterias Gram positivas poseen una pared celular gruesa formada de peptidoglicano y ácidos, lo que hace que las bacterias retengan el reactivo. (Prescott, 2004, p.29)

En las células Gram negativas (figura 1-13), el decolorante alcohol-cetona disuelve la membrana exterior de la pared celular, el peptidoglicano no puede retener el complejo cristal violeta lugol, provocando la decoloración de la misma. (Prescott, 2004, p.29)

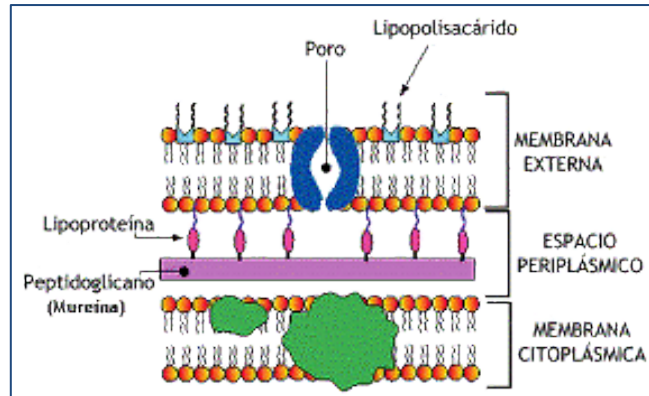


Figura 1-13: Pared celular de las bacterias Gram negativas

Fuente: (Seminario Tinciones, 2010)

Las paredes de las células Gram positivas son gruesas y contienen un 80-90% de peptidoglicano y ácido teicoico que es el responsable del determinante antigénico del organismo. Como se indica en la figura 1-14

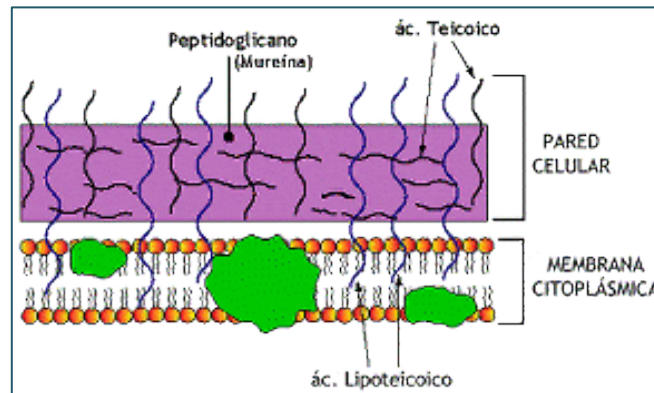


Figura 1-14: Pared celular de las bacterias Gran Positivas

Fuente: (Seminario Tinciones, 2010)

1.7.4.3. Morfología macroscópica

Las características macroscópicas se refieren a la apariencia, color, forma, estructura de la colonia, la cual se utiliza para complementar la identificación de la bacteria. Se lleva a cabo mediante la observación de las colonias que crecen en la superficie del medio sólido. El aspecto, tamaño y

forma de las colonias es constante para cada género o especie por lo que a la hora de diferenciar las bacterias hay que tomar en cuenta las siguientes características.

✓ Morfología de las colonias

Las características morfológicas principales de una colonia bacteriana aislada sobre un medio de cultivo son el tamaño, borde, elevación sobre el medio de cultivo, superficie, consistencia, pigmentación, olor, etc., como se indica en la figura 1-15 las cuales generan bases fundamentales que permiten estudiarlas de manera sistemática e identificarlas, algunas de estas características dependen del medio de cultivo y de las condiciones de incubación. En la tabla 1-14 se muestran algunas características morfológicas que pueden presentar las colonias bacterianas. (Fernández, 2010, p.4)

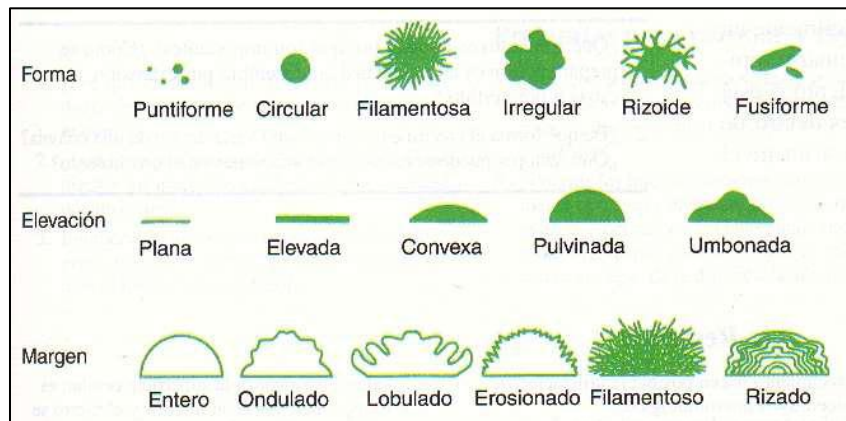


Figura 1-15: Morfología de colonias bacterianas

Fuente: Microbiología, 2014

Tabla 1-14: Morfología colonial

Tamaño de las colonias	Se mide en milímetros
Forma	Puntiforme, circular, irregular, filamentosa
Superficie	Lisa, rugosa, granular
Aspecto	Húmedo, seco
Luz reflejada	Brillante o mate
Luz transmitida	Opaca, translúcida, transparente
Consistencia	Suave (butirosa, mucóide, o friable), dura

Fuente: Peña, M. 2008

✓ Tamaño de las colonia

El tamaño de las colonias poseen un tamaño uniforme para cada especie, miden desde 0.5 mm en el caso de *Haemophilus sp.* o *N. gonorrhoeae* e incluso pueden ser de un tamaño mayor como en las enterobacterias. Algunas colonias miden menos de 1mm de diámetro como en los estreptococos y hasta 1 cm de diámetro en los estafilococos y algunos bacilos. En la tabla 1-15 se muestran características del tamaño de cada colonia. (Díaz, 2009)

Tabla 1-15: Tamaño de las colonias

Pequeño	Colonias puntiformes con un tamaño aproximado de 0,5 mm de diámetro
Mediano	De 1 a 2 mm de diámetro
Grande	De 4 a 6 mm de diámetro
Muy grande	Colonia extendida en forma de velo, invadiendo toda la superficie del medio de cultivo

Fuente: Peña, M. 2008

1.8 Aislamiento de microorganismos

Consiste en la separación de un determinado microorganismo del resto que le acompañan. El aislamiento de bacterias se realiza, mediante el desarrollo de colonias aisladas en medios de cultivos sólidos. A partir de la inoculación de una única célula inicial y tras un periodo de incubación y condiciones adecuadas, se da el crecimiento de un gran número de colonias observables y de morfología igual (un clon bacteriano). (Navarra, U. 2002)

1.8.1. Cultivo puro

Se define como cultivo puro al que contiene sólo un tipo de microorganismos. El cultivo se obtiene de colonias que fueron aisladas con el propósito de que las colonias que se desarrollen tengan la misma composición genética, son útiles para estudiar las características que poseen e identificarlos con seguridad. (Navarra, U. 2002)

1.9. Pruebas bioquímicas

Las pruebas bioquímicas consisten en una serie de pruebas químicas realizadas a las bacterias, las cuales mediante la reacción que presenten, permitirán identificar el microorganismo estudiado. El objetivo de usar estas pruebas es determinar que microorganismos tienen la capacidad de fermentar azúcares, degradar compuestos, producir enzimas, sensibilidad a sustancias etc. Para la realización de estas pruebas se usan múltiples medios los mismos que se usan según sean las exigencias del o los microorganismos. (Fernández, A. 2006 p. 8) (Macías, K. 2010, p.2)

1.9.1 Prueba de la Catalasa

La catalasa es una enzima que poseen la gran mayoría de microorganismos aerobios y anaerobios facultativos exceptuando a los *Streptococcus*. La catalasa descompone el peróxido de hidrogeno en agua y oxígeno gaseoso, el desprendimiento de burbujas que proceden del oxígeno es indicativo de

que la prueba es positiva. La prueba tiene como finalidad separar los *streptococcus* y *enterococcus* (negativos) de *micrococaceae* (positiva) (Fernández, A. 2006 p. 8) (urg.es,2012)



Figura 1-166: Prueba de la Catalasa

Fuente: Wikimedia, 2016

1.9.2 Prueba de la Oxidasa

La prueba de oxidasa permite determinar si la bacteria produce alguna de las citocromo oxidasas, la reacción se basa en el sistema de citocromo oxidasa que activa la oxidación del citocromo el cual por acción del oxígeno molecular se reduce produciendo agua o peróxido de hidrogeno según la especie bacteriana, el oxígeno actúa como aceptor final de electrones. (Fernández, A. 2006 p. 8) (Eikimedia, 2016) (goumh.umh.es, 2012)

El sistema citocromo oxidasa se encuentra en los organismos aerobios, algunos anaerobios facultativos y excepcionalmente, en algún microaerófilo. Los anaerobios facultativos carecen de actividad oxidasa. (Fernández, A. 2006 p. 8) (Eikimedia, 2016) (goumh.umh.es, 2012)

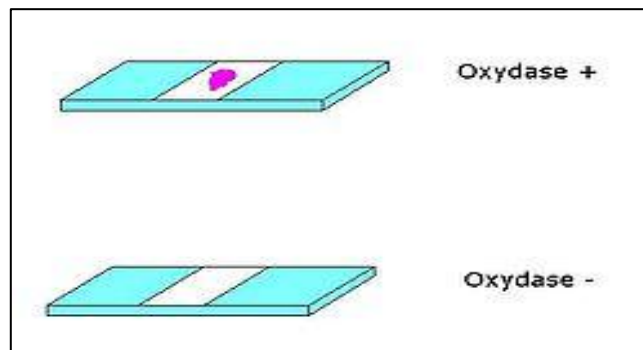


Figura 1-17: Prueba de la Oxidasa

Fuente: Wikimedia, 2016

1.9.3 Prueba de la coagulasa

La prueba de la coagulasa permite determinar la capacidad que tiene la enzima coagulasa de coagular el plasma, esta prueba es útil para diferenciar el *S. aureus* (coagulasa positivo) de otras especies de *Staphylococcus*. Los resultados tras la incubación pueden leerse a las 4 o 24 horas en la figura 1-18 se ilustra el resultado de coagulasa positiva (b) y coagulasa negativa (a). (Fernández, A. 2006 p. 8) (Fundación, usal.es)

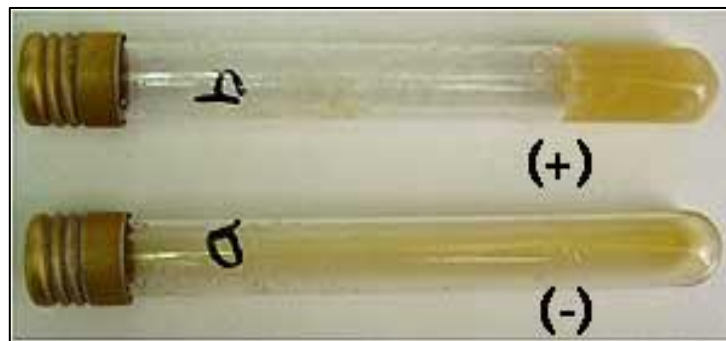


Figura 1-18: Prueba de la Coagulasa

Fuente: Fundación, usal.es

1.9.4. Crecimiento en caldo hipersalino

Esta prueba ayuda a determinar la capacidad que tienen algunos microorganismos de desarrollarse en medios de cultivo con una concentración de cloruro sódico del 6,5%, separando las especies de *Enterococcus* de los *Streptococcus*. El medio que sirve como base para esa prueba es el caldo soya triptícasea con cloruro de sodio al 6.5% (Fernández, A. 2006 p. 8)

1.9.5. Prueba Óxido-Fermentación (OF)

Permite determinar qué tipo de metabolismo energético: respiratorio (O) o fermentador (F) presenta el microorganismo, se usa la glucosa como sustrato y el azul de bromotimol es el indicador ácido-base que detecta la acumulación de ácidos. Las vías metabólicas permiten que los microorganismos obtengan nutrientes y energía, siendo la glucosa el carbohidrato más utilizado por las bacterias, la

vía respiratoria utiliza oxígeno un sinónimo de vía aerobia, el metabolismo fermentativo no utiliza oxígeno, sinónimo metabolismo anaerobio. (Fernández, A. 2006 p. 8) (McFadin, 2003pp223-232)

1.9.6. Prueba del agar hierro de Kligler

Esta prueba se utiliza en microbiología para la diferenciación de enterobacterias, en base a la fermentación de glucosa y lactosa, y a la producción de ácido sulfhídrico. La triptona y la peptona de carne son los nutrientes que permiten el desarrollo bacteriano, los hidratos de carbono fermentables son la glucosa y la lactosa. El cloruro sódico permite que se mantenga el balance osmótico, y el indicador de pH es el rojo de fenol. (Britanialab, 2010 p. 1)

Cuando existe la fermentación de azúcares hay la producción de ácidos, los mismos que se detectan mediante el indicador rojo de fenol el cual provoca el viraje del medio de rojo a amarillo en medio ácido. La producción de sulfuro de hierro de color negro se da cuando el tiosulfato de sodio se reduce a sulfuro de hidrogeno el mismo que reacciona con la sal de hierro. (Britanialab, 2010 p. 1)

1.9.7. Prueba del agar Simmons Citrato

Es un medio diferencial utilizado para la diferenciación de enterobacterias, en base a la capacidad de usar citrato como única fuente de carbono y energía. En el medio de cultivo los componentes fosfato es la fuente de nitrógeno y el citrato sódico la fuente de carbono, Las sales de fosfato forman un sistema buffer, el magnesio es cofactor enzimático. (Britanialab, 2012, p.1)

El desdoblamiento del citrato da como resultado el oxalacetato y piruvato este en presencia de un medio alcalino da origen a ácidos orgánicos y al ser usados como fuente de carbono producen carbonatos y bicarbonatos. El indicador de pH encargado de virar el color de verde a azul en medio alcalino es el azul de bromotimol el cual indica la producción de citrato permeasa. (Britanialab, 2012, p.1)

1.9.8. Prueba de la Ureasa

Esta prueba permite determinar la presencia de la enzima ureasa en los microorganismos, la misma es capaz de desdoblar la urea formando dos moléculas de amoníaco. Esta prueba se usa para diferenciar las especies de *proteus* de otros géneros de enterobacterias. Las bacterias que poseen la enzima ureasa, hidrolizan el nitrógeno proveniente de la urea, liberando amoníaco y dióxido de carbono, esto hace que el medio se alcalinice, haciendo virar el indicador rojo fenol del amarillo al rojo. (Fernández, A. 2006 p. 8) (Britanialab, 2012, p.1)

1.9.9. SIM

La prueba SIM permite determinar la movilidad, producción de Indol y sulfuro de hidrogeno de un microorganismos. Es un medio semisólido útil para diferenciar miembros de la familia Enterobacteriaceae. La formación del Indol se da por la intervención del triptófano ya que es un aminoácido constituyente de peptonas y de la tripteina. Ya que puede oxidarse para formar el Indol. En este proceso intervienen las enzimas triptofanasa (Fernández, A. 2006 pp. 8-9) (Britanialab. 2012)

El compuesto de color rojo indicativo de Indol positivo se da al reaccionar el aldehído del reactivo de Kovac's con el Indol producido por el microorganismo (Fernández, A. 2006 pp. 8-9) (Britanialab. 2012)

La movilidad se aprecia cuando el medio de cultivo presenta turbidez que se produce alrededor de la punción de siembra. La cepas productoras de sulfhídrico se identifican cuando en el medio hay un precipitado negro resultante del sulfuro de hierro a partir del tiosulfato para ello el medio de cultivo debe poseer un pH mayor a 7,2. (Britanialab. 2012)

1.9.10 Hidrólisis de la gelatina

Esta prueba permite determinar la capacidad de ciertos microorganismos de hidrolizar la gelatina a péptidos y aminoácidos, mediante la acción de enzimas gelatinasas. (Fernández, A. 2006 p. 9)

1.9.11 Hidrólisis del almidón

Este medio se usa para determinar los microorganismos productores de amilasas, esta actividad es revelada colocando gotas de Lugol que tiñe el almidón de azul y deja un halo claro en el lugar donde el almidón fue hidrolizado enzimáticamente en sustancias más simples y asimilables. (Fernández, A. 2006 p. 9) (Mendo R, 2016)

1.10. Antimicrobiano

Son sustancias químicas producidas por un microorganismo (hongo o bacteria), sintética o semisintética que inhibe el crecimiento de otro organismo (efecto bacteriostático) o lo destruye (efecto bactericida), se dividen en antibacterianos, antivirales, antimicóticos, antimicrobacterianos, antiparasitarios. (Quintana, 2004)

1.10.1. Antibiótico

Son sustancias con actividad antibacteriana, generalmente son medicamentos usados en el tratamiento de infecciones bacterianas. Establecen un grupo heterogéneo de sustancias con un variado comportamiento farmacocinético y farmacodinámico, ejercen su acción sobre una estructura o función del microorganismo, poseen elevada potencia biológica por lo cual pueden actuar a concentraciones bajas y su toxicidad es selectiva. (Quintana, 2004)

1.11. Resistencia antimicrobiana

La resistencia a los antimicrobianos se refiere a la capacidad que poseen los microorganismos (hongos, virus, bacterias, parásitos) para resistir los efectos tóxicos de un antibiótico, los microorganismos sufren cambios que hacen que los antibióticos utilizados ya no sean eficaces. (OMS, 2014)

La resistencia bacteriana en los últimos años ha resultado ser un problema creciente con implicaciones sociales y económicas dadas por el incremento de morbilidad y mortalidad, aumento de los costos de tratamientos y de las largas estancias en instituciones hospitalarias. (Sussmann, O, 2010 p.1)

1.11.1. Causas de la resistencia a los antibióticos.

Algunas de las causas que provocan la resistencia a los antibióticos son:

- Los pacientes que no han tomado el número de dosis completo de antibióticos.
- El uso indiscriminado de antibióticos.
- La utilización generalizada de antimicrobianos en pacientes inmunocomprometidos y en la unidad de cuidados intensivos.
- El uso de dosis o duración inadecuada de la terapia antimicrobiana, por ejemplo no toman los antibióticos como le indica el médico, Esto puede ayudar a que los gérmenes crezcan y se vuelvan más fuertes.
- El desconocimiento de los perfiles de sensibilidad de los diferentes gérmenes teniendo en cuenta la flora local de cada institución o comunidad. (FDA, Office of Women's Health, 2007, p.2) (Sussmann, o.et, al, 2010, p. 2)

1.11.2. Tipos de resistencia

La resistencia antibiótica es aquella cuya información puede ser natural o adquirida

- **Intrínseca.-** La resistencia intrínseca es propia de cada familia, especie o grupo bacteriano. Se produce por mutaciones al azar o por la ausencia de la diana biológica. Ejemplo, todos los gérmenes Gram negativos son resistentes a la vancomicina. (R. Vignoli, & V. Seija, 2006, p. 650)
- **Adquirida.-** Cuando afecta algunos integrantes de una determinada especie pero no a la totalidad, esta puede ser cromosómica cuando la información se incorpora a la bacteria o se origina por mutación espontánea (cambio genético). Extracromosómica cuando el material

genético se incorpora por fuera del cromosoma, mediante plásmidos. (Apaza R & Garcia M, 2011, p. 5)

1.11.3. Mecanismos de resistencia

Existen varios mecanismos de resistencia ya que los genes pueden transmitirse de forma horizontal o vertical. Esta transmisión es frecuente en el caso de resistencias codificadas en genes plasmídicos. (Sussmann, O.et, al, 2010 pp. 4-7)

1.11.3.1. Transferencia horizontal de genes

La transferencia horizontal de genes consiste en el traspaso de información genética entre bacterias, permite que las bacterias puedan adaptarse al medio. Las vías de transferencia genética que usan las bacterias son conjugación, transducción y transformación (Figura 1-22). Estos mecanismos diseminan genes de virulencia, la transmisión genera plasticidad en el genoma. (Moreno C. et.al. 2009 p.3)

1.11.3.2. Transferencia vertical de genes

La transferencia vertical ocurre cuando un organismo recibe material genético de sus ancestros, como en el caso de las bacterias en las cuales la transferencia vertical ocurre por fisión binaria cuando las bacterias se duplican. La reproducción binaria es un proceso asexual que no deja descendencia diferente a la célula madre. (Moreno C. et.al. 2009 p.3)

1.11.3.3. Conjugación

Este proceso se realiza por medio de plásmidos, los cuales tienen la capacidad de transferirse de una célula a otra debido a la cercanía de ambas células mediante un pili sexual o un poro de conjugación. Los plásmidos poseen movilidad autónoma, tienen forma circular y poseen replicación

propia, en su información genética poseen cassetes génicos que codifican diversas funciones entre ellas la resistencia bacteriana. (Moreno C. et.al. 2009 p.3)

1.11.3.4. Transducción

Consiste en la transferencia de material genético de una bacteria a otra mediante bacteriófagos (virus que infectan la bacteria), los bacteriófagos pueden integrarse al genoma transfiriendo a otra célula, llevan consigo parte del genoma de la bacteria entre otro los genes de resistencia antimicrobiana. (Moreno C. et.al. 2009 p.4)

1.12.3.5. Transformación

Es la captura de ADN extracelular, que puede integrarse en el genoma y expresarse. (Moreno C. et.al. 2009 p.4)

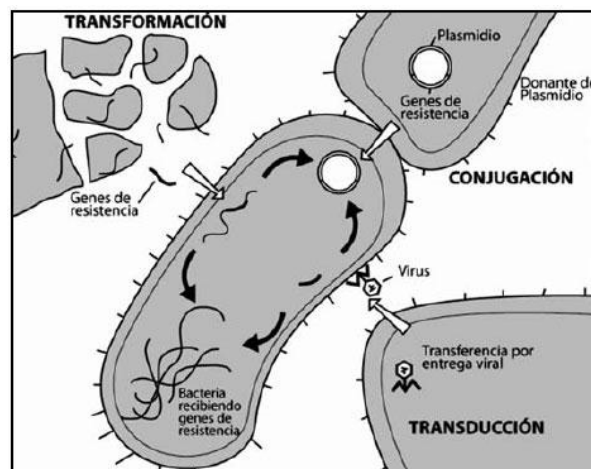


Figura 1-19: Trasterencia horizontal de genes.

Fuente: Moreno Claudia, 2009

Los mecanismos de resistencia son:

- 1) Enzimas hidrolíticas.- Las bacterias sintetizan enzimas que hidrolizan al antimicrobiano, destruyendo su acción antibacteriana, sin tener la posibilidad de actuar sobre el bacteria. La producción de β -lactamasas es el mecanismo más abundante de resistencia antibiótica. Las mutaciones de β -lactamasas de espectro extendido manifiestan resistencia a cefalosporinas de 3^a generación (ceftriaxona).

Para poder combatir esta resistencia se utiliza un inhibidor enzimático que presenta afinidad a la enzima e impide la destrucción del antimicrobiano y de esta manera permite su acción (clavulanato y sulbactam). (Moreno C. et.al. 2009 p.3)

- 2) Modificación del sitio activo.- La modificación de un aminoácido genera un blanco diferente que disminuye la afinidad de unión por el antimicrobiano.

Un ejemplo de esto lo constituye la modificación en PBP (*penicillin-binding-protein*) que es un complejo enzimático que permite la síntesis del peptidoglicano, presente en mayor proporción en bacterias Gram positivas, si se produce mutación del sitio de unión al antimicrobiano como los β -lactámicos, éstos no pueden actuar generando resistencia. (Moreno C. et.al. 2009 p.3)

Modificación ribosomal: Los genes *erm A* y *erm B* modifican el sitio activo del ribosoma, mediante metilación, es importante en la resistencia a macrólidos en *S. pneumoniae* y *S. pyogenes*. (Moreno C. et.al. 2009 p.3)

- 3) Disminución de la permeabilidad de la pared celular al ingreso del antimicrobiano.- Cambios en el diámetro y/o número de porinas (proteína que forma poros en la membrana externa de las bacterias Gram- Negativas) pueden bloquear el ingreso del antimicrobiano a la bacteria. (Moreno C. et.al. 2009 p.3)
- 4) Bombas de flujo.- Este mecanismo transporta al antimicrobiano hacia el exterior de la célula sin modificaciones, pero no presenta acción antimicrobiana. Existen bombas de eflujos multidrogas en la pared bacteriana que permiten la expulsión de drogas como los antimicrobianos. Los genes involucrados son *MefA* (*Streptococcus pneumoniae*), *NorA* (*Staphylococcus aureus*) y *Mex* (*Pseudomonas aeruginosa*). Estos genes expresan la resistencia a macrólidos en estos patógenos y a fluoroquinolonas. (Moreno C. et.al. 2009 p.1)

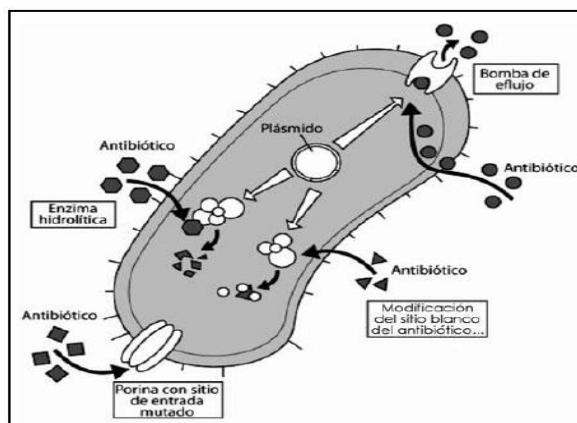


Figura 1-20: Mecanismos de resistencia antimicrobiana

Fuente: (Moreno C. et.al. 2009 p. 4)

1.12. Antibiograma.

El antibiograma es un método *in vitro* que permite determinar si la bacteria presenta resistencia o sensibilidad frente a varios antimicrobianos, se realiza mediante la utilización de discos de papel impregnados con antibióticos los cuales se colocan en una caja Petri que contiene el inóculo. Ver figura 1-21

El antibiograma es la prueba que se utiliza en microbiología para evaluar la eficacia de un antibiótico o grupo de antibióticos sobre la bacteria. Si la bacteria presenta sensibilidad el antibiótico será eficaz, si es medianamente sensible el antibiótico será eficaz en ciertas condiciones y si presenta resistencia el antibiótico será ineficaz. (Errecalde, J. 2004, p.51)

El efecto antimicrobiano puede ser:

- Bacteriostático.- Cuando el antibiótico causa una inhibición del crecimiento microbiano, no crecen en presencia del antibiótico, pero tampoco mueren, si se elimina el antibiótico, los microorganismos podrían volver a crecer, si los microorganismos van muriendo en presencia del bacteriostático, estos lo harán de forma lenta durante el transcurso del tiempo. (Paredes, F & Roca, J. 2004)

- **Bactericida.**-Un antibiótico se considera bactericida cuando la presencia del antibiótico produce la muerte del microorganismo. Pertenecen a este grupo los antibióticos β -lactámicos, aminoglucósidos, rifampicina, vancomicina, polimixinas, fosfomicina, quinolonas y nitrofurantoínas. (Paredes, F & Roca, J. 2004)
- **Bacteriolíticos.**- Los antibióticos son considerados bacteriolíticos cuando matan a los microorganismos por lisis celular. (Cecilia Toro, 2008, p. 4)

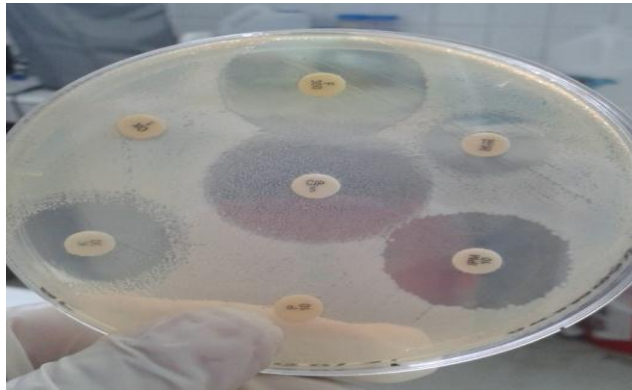


Figura 1-21: Antibiograma de las aguas termales de Cunuyacu

Fuente: BENAVIDES Cyntia, 2017

1.12.1. Discos de antibiograma

Los discos de antibiograma son fabricados en casas comerciales bajo un control estricto internacional. Cada disco de antibiograma tiene impregnado una concentración predeterminada de antibiótico que permite una correlación más o menos precisa con la concentración mínima inhibitoria (CMI) que dicho antibiótico alcanza "in vivo".

Los discos deben conservarse adecuadamente ya que de ellos depende la confiabilidad de los resultados que arroje el antibiograma. El recipiente que contiene los discos debe mantenerse en refrigeración a una temperatura de 4-5°C, o almacenados a -20°C hasta su utilización. Los discos que contengan drogas de la familia cefalosporinas y penicilinas deben mantenerse congelados. (Bernal M. & Guzmán M, 1984, pp1-10)

Antes de usar los discos de sensibilidad deben colocarse a temperatura ambiente, y se debe tener mucha precaución con las fechas de caducidad de los discos, ya que si han caducado estos deberán ser inmediatamente desechados. Los discos deben mantenerse secos hasta que se utilicen. (Bernal M. & Guzmán M, 1984, pp1-10)

Los discos para el antibiograma son seleccionados de acuerdo al grupo de microorganismos, ya sean Gram positivos o Gram negativos. Como se indica en la figura 22-1 y en la tabla 16-1

OPCION	GRAM NEGATIVOS				GRAM POSITIVOS		
	INTESTINAL	URINARIA	SANGRE TEJIDOS	<u>Ps.</u> aeruginosa	Staphylococcus	Streptococcus faecalis (D)	OTROS
PRIMERA	Ampicilina	Acido oxolinico	Amikacina	Carbenicilina	Penicilina G.	Ampicilina	Ampicilina
	Gentamicina	Acido nalidixico	Ampicilina	Amikacina	Oxacilina	Cloranfenicol	Penicilina G
	Cloranfenicol	Norfloxacina	Gentamicina	Gentamicina	Eritromicina	Tetraciclina	Oxacilina
	Trimetoprim-Sulfa	Nitrofurantoina	Cloranfenicol	Tobramicina	Cloranfenicol	Eritromicina	Clindamicina
	Tetraciclina	Sulfisoxazole	Cefamandole	Polimixina B	Clindamicina'	Penicilina G	Eritromicina
	Trimetoprim-Sulfa	Trimetoprim-Sulfa				Tetraciclina	
SEGUNDA		Ampicilina	Cefoxitina	Colistina	Gentamicina		Gentamicina
		Cloranfenicol	Cefotaxima		Netilmicina		Trimetoprim-Sulfa
		Gentamicina	Kanamicina		Vancomicina		Cloranfenicol

Figura 1-22: Guía para la selección de antimicrobianos

Fuente: (Bernal M. & Guzmán M, 1984, pp1-10)

Tabla 1-16: Discos utilizados para el antibiograma

Gram Positivos	Gram Negativos
Oxacilina (OX)	Carbenicilina (PY)
Kanamicina (K)	Trimetoprima/sulfametoxazol (SXT)
Amoxicilina /ácido clavulánico (AMC)	Amoxicilina /ácido clavulánico (AMC)
Cefalotina (KF)	Cefalotina (KF)
Ceftriaxona (CRO)	Ceftriaxona (CRO)
Ciprofloxacina (CIP)	Kanamicina (K)
Penicilina (P)	Ciprofloxacina (CIP)
Vancomicina (VA)	Estreptomicina (S)
Tetraciclina (TE)	Tetraciclina (TE)
Imipenem (IMP)	Imipenem (IMP)
Ampicilina (AM)	Ampicilina (AM)
Nitrofurantoina (F)	Nitrofurantoina (F)
Gentamicina (CN)	Gentamicina (CN)

Realizado por: BENAVIDES Cyntia, 2017

1.12.2. Discos utilizados para pruebas específicas de identificación bacteriana

➤ Discos de Ácido Nalidíxico

El Ácido Nalidíxico, es un antibiótico que pertenece a la primera generación de las quinolonas, se usa en el tratamiento de infecciones urinarias producidas por bacterias Gram Negativas. Los gérmenes que son sensibles al Ácido Nalidíxico son las *Enterobacterias sp*, *Escherichia coli*, *Klebsiella sp*, *Proteus mirabilis*, *proteus vulgaris*, *Salmonella sp*, *Shigella sp*. (Vademecum, 2005)

El Ácido Nalidixico interfiere con la síntesis de ADN, y la resistencia a este antibiótico se desarrolla con bastante rapidez. (Vademecum, 2005)

➤ Disco de Optoquina

Para determinar la fragilidad de la membrana celular bacteriana se realiza la prueba de sensibilidad a la optoquina. La prueba de la Optoquina se utiliza para diferenciar *Streptococcus pneumoniae* que son sensibles a este antibiótico de otros *Streptococcus* α - hemolíticos. La optoquina inhibe el crecimiento de *Streptococcus pneumoniae*, mientras que otros estreptococos no son inhibidos como se indica en la figura-1-23. (Huertas, M. 2014)

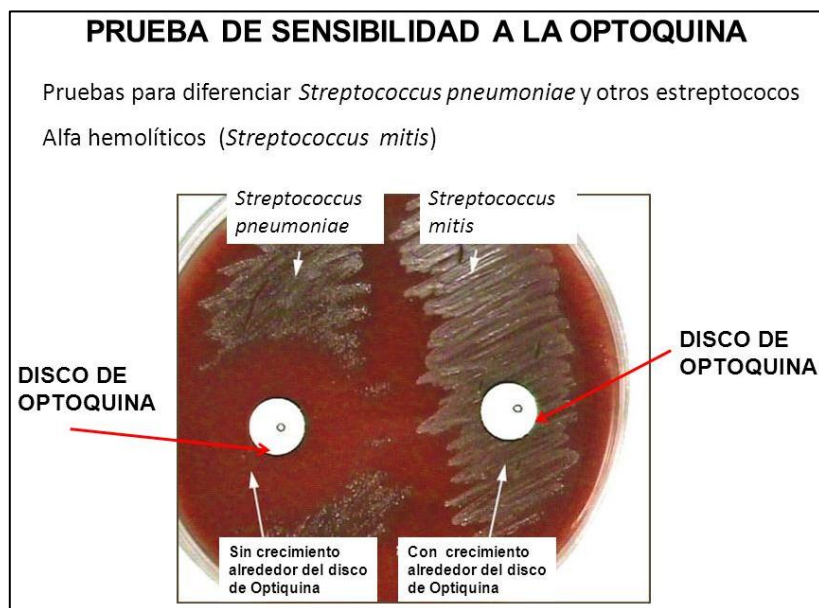


Figura 1-23: Prueba de optoquina

Fuente: ARANGUREN, 2014

➤ Disco de Novobiocina

Los Discos de Noviocina están impregnados de una concentración de novobiocina de 5ug que permiten identificar al *Streptococcus epidermidis* ya que presenta sensibilidad a ese antibiótico (Figura 1-24). (Boquet, 1995, p.133)

La Novobiocina es un antibiótico de uso oral, útil en el tratamiento infecciones urinarias e infecciones por *S.aureus* resistentes a otros fármacos, es un medicamento bacteriostático que

interfiere en la síntesis de la pared bacteriana, su uso es muy bajo ya que provocan reacciones adversas. (Vademecum, 2004)

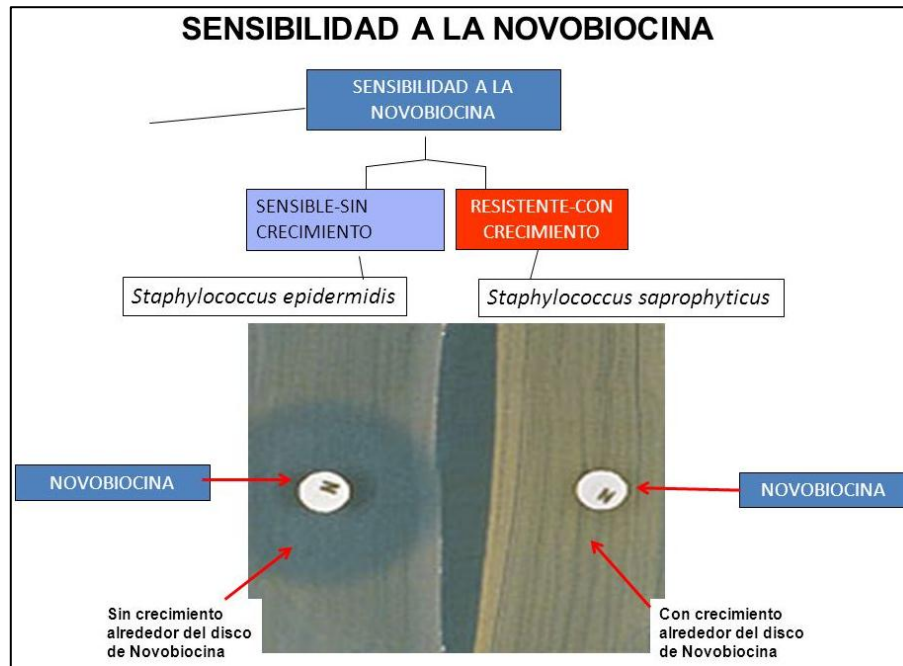


Figura 1-24: Sensibilidad a la Novobiocina

Fuente: Aranguren, 2014

➤ Disco de Bacitracina

El disco de Bacitracina se utiliza en la prueba que diferencia los estreptococos β - hemolítico del grupo A de Lancenfield de otros estreptococos β -hemolíticos. (Britanialab, 2010)

El disco de Bacitracina presenta una concentración de 0.04 U. Los *micrococcus* y los *estomatococcus* también son inhibidos, mientras que los estafilococos coagulasa negativo son resistentes. (Figura 25-1) (Britanialab, 2010)



Figura 1-25: Prueba de la sensibilidad a la Bacitracina

Fuente: Aranguren, 2014

1.12.3. Difusión del agar

La prueba de difusión en disco es la prueba más usada debido a su simplicidad y economía, los discos de antibióticos contienen concentraciones de principio activo necesarias y son colocados sobre el medio de cultivo previamente inoculado con un germen estandarizado al cual se desea medir su susceptibilidad. Posteriormente la placa se coloca en la estufa por un tiempo y temperatura determinada en este proceso comienza el crecimiento de la bacteria y también la difusión del disco de papel. (Errecalde, J. 2004, p19)

El antibiótico se difunde del disco según un gradiente de dilución de modo que a mayor distancia menos concentración. El diámetro del halo de inhibición que se forma es directamente proporcional a la potencia del antibacteriano frente a la bacteria estudiada, e inversamente proporcional a la concentración inhibitoria mínima (CIM) del agente antimicrobiano. Este resultado es cualitativo, es decir que permite determinar si el germen es sensible o resistente o semi-cualitativo que indica si el germen es susceptible, medianamente susceptible o resistente. (Errecalde, J. 2004, p19)

1.12.4. Medición del Halo de inhibición

Para la medición del halo de inhibición formado por la acción del antibiótico presente en el disco se debe colocar la caja Petri en una superficie oscura bajo luz reflejada. Para medir la zona de inhibición se debe incluir la medida del disco de papel, esto se realiza con una regla (Figura 1-26) sobre el respaldo de la caja de Petri sin remover la tapa. (Bernal M. & Guzmán M, 1984, pp1-10)

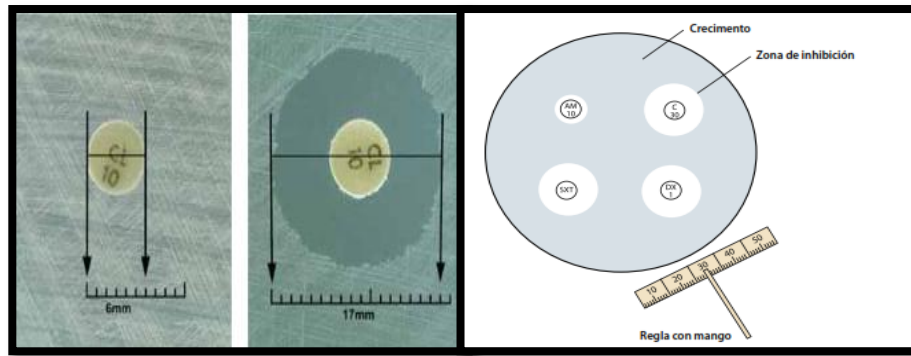


Figura 1-26: Medición del Halo de inhibición

Fuente: Errecalde, J. 2004

CAPITULO II

2. MARCO METODOLOGICO

2.1 Lugar de investigación

Este trabajo de titulación se realizó en las aguas termales de Cunuyacu ubicadas en la parroquia Pastocalle perteneciente a la provincia de Cotopaxi. Fueron tomadas cuatro muestras (1, 2, 3,4) de agua termal en recipientes de plásticos estériles, en tres lugares diferentes de la fuente (Figura 1-2.) simultáneamente se determinó la temperatura y el pH



Figura 2-1: Sitios de muestreo de las aguas termales de Cunuyacu

Fuente: BENAVIDES Cyntia, 2017

2.1.1. Aguas Termales Cunuyacu de Pastocalle provincia de Cotopaxi

2.1.2 Parroquia Pastocalle

La parroquia Pastocalle está ubicada al noroccidente de la provincia de Cotopaxi, a una distancia de 25km de la ciudad de Latacunga hasta el centro parroquial, presenta una altitud de 2700 hasta los 3800 m.s.n.m, cuenta con una superficie total de 135Km². Esta se encuentra atravesada por la panamericana central de Latacunga y por el callejón interandino.



Figura 2-2: Mapa de ubicación del cantón Latacunga

Fuente: La Tolita express, 2010

2.1.3. Aguas Termales Cunuyacu

Las aguas termales de Cunuyacu se encuentran en la reserva de los Illinizas, que están ubicadas en la parroquia de Pastocalle, situada a 20 minutos al norte de Latacunga, de ahí se toma el camino que se dirige a los Illinizas por el barrio El Milagro, durante el recorrido se puede observar sembradíos de cebolla, maíz, ganado de leche, grandes praderas verdes y manadas de borregos.

A 11 Km de recorrido por un camino de tercer orden, el vehículo se queda en el parqueadero, al frente de este se levanta el majestuoso volcán Cotopaxi observándose también los picos y la nieve de Los Illinizas. (Vive Latacunga, 2012)



Figura 2-3: Aguas termales Cunuyacu.

Fuente: BENAVIDES Cyntia, 2017

La Cascada de Cunuyacu (Figura 2-3) significa cascada de conejos, llamada de esta manera por los cientos de conejos que viven alrededor de este ecosistema, está ubicada a 4.046 m.s. n. m., esta pequeña cascada presenta una caída de agua de 13 m de altura aproximadamente, el lugar de donde se origina el agua de la cascada se ubica a 1 km de distancia, cuenta con dos vertientes volcánicas del Illiniza sur, el agua es transparente, y cae en el encañonado formando una fosa que toma una tonalidad amarillenta ferrugosa, por el hierro y el azufre. (Pastocalle, 2012)

Con un poco más de recorrido se llega a una vertiente natural de aguas termales que salen de la montaña, las cuales se depositan en una fosa natural hecha de piedra; que forman una piscina natural. (Pastocalle, 2012)

2.2 Tipo de estudio

- De acuerdo al enfoque el estudio fue cualitativo, se describieron las características de los clones obtenidos.
- Por el alcance el estudio fue descriptivo
- De acuerdo a la proyección fue prospectivo, los datos fueron recolectados a medida que las muestras se iban procesando y siguiendo cada etapa de la investigación
- Por el número de veces que se mide la variable fue transversal pues en esta investigación no se va realizar un seguimiento posterior
- De acuerdo al control de la variable fue un estudio observacional, pues no se controlaron factores de estudio, únicamente se observó, conto y analizo cada uno de los resultados obtenidos

2.3 Población

En este trabajo de Investigación la población fueron los manantiales de agua termal de Cunuyacu ubicados en la Parroquia Pastocalle perteneciente a la provincia de Cotopaxi.

2.4 Muestra

Las muestras estudiadas fueron obtenidas de la fuente termal de Cunuyacu.

2.5 Tamaño de la muestra

Se realizó un muestreo en la fuente termal de Cunuyacu para el análisis microbiológico, el volumen tomado de cada muestra fue de 100 mL aproximadamente de agua termal

2.6 Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Las técnicas e instrumentos utilizados para el análisis microbiológico de las aguas termales de Cunuyacu fueron:

- Medición de los parámetros físico-químicos de los manantiales termales in situ se llevaron a cabo con la ayuda de tirillas de pH y un termómetro.
- La observación del crecimiento de las diferentes colonias de microorganismos en los agares y los resultados obtenidos al ejecutar las pruebas de identificación
- La observación de la tinción Gram de las colonias obtenidas y aisladas con la ayuda del microscopio óptico para determinar la morfología de cada microorganismo
- Medición de los halos de inhibición de los antibiogramas realizados para cada clon puro escogido.
- De cada prueba realizada se registraban los datos obtenidos en un cuaderno de apuntes.

2.7. Procesamiento y plan de análisis de datos

Los datos fueron procesados mediante una estadística inferencial usando el programa Microsoft Excel, una vez ingresados se determinó un total, promedio, varianza, desviación estándar y porcentajes respectivamente

2.8 Materiales, equipos y reactivos

2.8.1 Material Biológico

Agua termal de Cunuyacu que fue tomada de cuatro puntos que incluyeron los ojos de agua (M1 y M2), la piscina (M3) y agua de un chorro intermedio haciendo un raspado de abajo hacia arriba (M4)

2.8.2 Materiales

- Aguja de Inoculación
- Aplicador plano 3M Petrifilm
- Algodón
- Toallas de papel
- Asa de inoculación
- Asa de vidrio
- Cajas Petri
- Cinta indicadora para esterilización
- Cinta maskin
- Cofia
- Cooler pequeño
- Dermo
- Erlenmeyer de 250 y 500mL
- Espátula
- Frascos de plástico estériles
- Frascos de vidrio de 500mL
- Fundas plásticas negras y rojas
- Fundas ziploc
- Hisopos de madera
- Gasas
- Gradilla
- Guantes

- Gotero de vidrio
- Jeringuilla de 5mL
- Marcador
- Mascarilla
- Mechero
- Pinza metálica
- Palillos de madera Papel aluminio
- Parafilm (Laboratory Film)
- Pera de succión
- Pipeta graduada de 10 MI
- Pipeta Pasteur
- Pipetas automáticas de 100 y 1000 uL(Accumax PRO)
- Pipetas automáticas de 20 y 500 uL(CLINIPET)
- Placas 3M Petrifilm: Aerobios totales, *Escherichia coli* y coliformes, Staph Express, Mohos y Levaduras
- Placas porta objetos (Goldlab)
- Probetas de 50, 100 y 250MI
- Puntas plásticas amarillas y azules (Citotest)
- Termómetro de 360° C
- Tubos de tapa roja
- Tubos de vidrio de 5mL
- Vasos de precipitación de 100 y 250 mL
- Caldo cerebro corazón .(MERCK)
- Caldo soya tripticasa .(MERCK)
- Cloruro de sodio(J.T. Baker)
- Cloruro mercuríco HgCl₂.(MERCK)
- Cristal violeta (Quimical)
- Discos de antibióticos: optoquina 5ug, estreptomina 300ug(Oxoid)
- Discos de antibióticos: trimetoprima-sulfametoxazol 25ug, nitrofurantoina 300ug, ceftriaxona 30ug, amoxicilina + ácido clavulánico 30ug, gentamicina 10ug, imipenem 10ug, ampicilina

10ug, cefalotina 30ug, ciprofloxacina 5ug, eritromicina 15ug, penicilina 10U, oxacilina 1ug, novobiocina 5ug, ácido nalidíxico 30ug, bacitracina 0.04U, carbenicilina 100ug, kanamicina 30ug, tetraciclina 30ug, vancomicina 30ug, (Bioanalyse)

- Gelatina para microbiología (MERCK)
- Glucosa monohidratada (MERCK)
- Lugol (Quimical)
- Peróxido de hidrógeno
- Plasma citratado
- Reactivo de Kovacs (Himedia)
- Safranina (Quimical)
- Simmons citrato,
- Solución de yodo yodurado
- Suero fisiológico (Lamosan)
- Tego al 1%
- Tiras de oxidasa (Hardy- Diagnostics)
- Tiras de pH
- Vaselina

2.8.3 Equipos

- Autoclave(Tuttnauer)
- Balanza analítica
- Cámara de flujo laminar (NUAIRE)
- Centrífuga (Dynac III)
- Estufa bacteriológica (memmert)
- Microscopio óptico (OLYMPUS)
- Refrigeradora (Indurama)
- Reverbero
- Unidad de lectura con luz para aglutinación

2.8.4 Reactivos

- Aceite de inmersión
- Ácido clorhídrico concentrado
- Agar base sangre (acumedia)
- Agar Eosina Azul de Metileno (acumedia)
- Agar Hugh y Leifson (DIFCO)
- Agar Kligler .(MERCK)
- Agar MacConkey (DIFCO)
- Agar Manitol Salado (acumedia)
- Agar Mueller Hinton(HIMEDIA)
- Agar Nutritivo (DIFCO)
- Agar SalmonellaShigella.(MERCK)
- Agar SIM .(MERCK)
- Agar Simmons Citrato.(MERCK)
- Agar Úrea .(MERCK)
- Agua destilada
- Alcohol-cetona (Quimical)
- Almidón soluble (maicena)

2.9 Métodos y técnicas

2.9.1 Muestreo

Se realizó un muestreo de las aguas termales de Cunuyacu de los sitios más representativos como se indica en la figura 1-2

2.9.2. Recolección de la muestra

Siguiendo el siguiente protocolo se procedió a tomar las muestras de las aguas termales de Cunuyacu

- Abrir el frasco de plástico estéril cerca del lugar donde se va a tomar la muestra, evitando no tocar la boca ni el interior para no contaminarlo.
- Una vez destapado el recipiente se tomó del cuello se colocó la boca del recipiente en sentido contrario de la corriente de agua.
- Lavar el recipiente por dos ocasiones con el agua termal del lugar de muestreo
- Tomar la muestra de agua definitiva llenando las $\frac{3}{4}$ partes del mismo
- Tapar inmediatamente el frasco con la muestra y sellarlo con parafilm para evitar que la muestra se riegue. (NTE INEN 2169:1998)(NTE INEN 2176)
- Las muestras se trasladaron en un cooler temperatura ambiente hasta el laboratorio.

2.9.3. Identificación de las muestras

Las muestras de agua fueron tomadas en recipientes de plástico. Las muestras fueron identificadas luego de la recolección evitando de este modo posibles errores

En el cuaderno de apuntes se anotó datos importantes y relevantes como:

- Sitio exacto del muestreo
- Características del lugar de muestreo
- Fecha de la recolección
- Hora de la recolección
- Método de recolección
- Condiciones atmosféricas
- Nombre del recolector (NTE INEN 2169:1998)(NTE INEN 2176: 1998)

2.9.4 Análisis Físico-Químico in situ

- El análisis se realizó de manera in situ, con ayuda de un termómetro de mercurio se midió la temperatura del ambiente y la temperatura de los sitios específicos de recolección de la muestra de agua.
- El pH del agua se midió con ayuda de las tiras para determinar pH

2.9.5. Transporte de las muestras

Las muestras recolectadas en las aguas termales fueron transportadas desde Cunuyacu hasta el laboratorio de Análisis Bioquímicos y Bacteriológicos de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH a temperatura ambiente, protegida de la luz y de cualquier otro contaminante. (NTE INEN 2169:1998)

2.9.6 Análisis Microbiológico

Los análisis de laboratorio fueron realizados en un tiempo menor a 24 horas después de haber sido tomada la muestra, en una cámara de flujo laminar previamente desinfectada con una solución de Tego al 1% y con luz UV por 20 minutos.

2.9.6.1. Siembra de las muestras de agua termal en placas Petrifilm 3M para el recuento rápido de Aerobios mesófilos, Escherichia .coli y coliformes, Staph Express, mohos y levaduras

Las placas Petrifilm fueron sacadas de la refrigeradora el día de la siembra y colocadas en la cámara de flujo laminar hasta que alcancen la temperatura ambiente, cabe recalcar que las muestras fueron sembradas por duplicado.

Siembra en las placas 3M Petrifilm

- En la cámara de flujo laminar y con el mechero encendido se abrió por un lado el empaque y se sacó la placa Petrifilm 3M
- La placa Petrifilm 3M se colocó en una superficie plana.
- En un extremo de la placa se procedió a codificar la placa de acuerdo al lugar de donde fue tomada la muestra.
- Se alzó el film superior, en el centro del film inferior de la placa Petrifilm se colocó 1 mL de la muestra con la ayuda de una pipeta automática.
- Se bajó con cuidado el film superior evitando la formación de burbujas de aire.
- En el centro de la placa se ubicó el aplicador plano 3M Petrifilm con la cara lisa hacia arriba y se ejerció presión suave sobre el mismo, para distribuir la muestra de forma homogénea,

- Luego se alzó el aplicador dejando de 2 a 5 minutos para que solidifique el gel. (3M MEXICO, 2004) (3M ESPAÑA S.A., 2002)

Incubación de placas 3M Petrifilm

- Las placas 3M Petrifilm se colocaron en pila de 5 con la cara transparente hacia arriba y se incubaron en estufa a 35°C por 24 horas para Staph Express y aerobios, los Petrifilms de *Escherichia coli* y coliformes se incubaron por un tiempo de 24 a 48 horas y las Petrifilms de Mohos y levaduras se incubaron a temperatura de 25° C durante 5 días, cabe mencionar que existieron placas que necesitaron más tiempo de crecimiento, por lo que el tiempo de incubación y crecimiento varía dependiendo de las colonias.
- Finalizado el tiempo de incubación los resultados obtenidos fueron expresados como Unidades Formadoras de Colonias (UFC/mL). (3M MEXICO, 2004)(3M ESPAÑA S.A., 2002)

Interpretación de los resultados de las placas 3M Petrifilm

Las placas 3M Petrifilm se observaron a la luz y se realizó el conteo de las colonias que habían crecido en el área donde fueron sembradas, se tomó en cuenta todas las colonias independientemente de su color, tamaño y forma

Se realizó la lectura de cada uno de los Petrifilms sembrados teniendo en cuenta lo siguiente:

- Para la placa Petrifilm de aerobios se contaron colonias de color rojo y azul (3M MEXICO, 2004)
- Para la palca Petrifilm de *Escherichia coli* y coliformes se encontraron colonias rojas o azules con o sin gas, además se toma en consideración que una placa de fondo azul purpura indica elevadas concentraciones de *Escherichia coli*, mientras que una placa de fondo rojo oscuro indica elevadas concentraciones de Coliformes y si el fondo de la placa es de color amarillo nos indica que existe altas concentraciones de no-Coliformes (3M, 2006) (3M MEXICO, 2006)
- Para la placa de Staph Express las colonias de color rojo violeta se contaron como *Staphylococcus aureus*, las colonias de color azul verde se contaron como no son

Staphylococcus aureus y las de color negro como pueden o no ser *Staphylococcus aureus* (3M ESPAÑA S.A., 2002)

- Para la placa de mohos y levaduras se contaron como levaduras las colonias pequeñas. De borde definido. Elevadas, de color canela rosado a verdeazulado, mientras que para mohos se contaron las colonias grandes, con bordes difusos, color verde azulado y de centro oscuro. (3M, 2006)

2.9.6.2 *Siembra de las muestras de agua termal en agar eosina azul de metileno y agar manitol salado, recuento de las colonias crecidas y de las colonias que fermentaron lactosa y manitol respectivamente.*

- Se colocan las cajas Petri con agar eosina azul de metileno y manitol salado en la cámara de flujo laminar para atemperar.
- Se etiquetaron las cajas Petri, dos de eosina azul de metileno y dos de manitol salado con los códigos asignados, la cantidad de muestra que se va a colocar (20µL y 100µL) y la fecha
- En una caja Petri de vidrio se colocó un poco de alcohol industrial
- Se tomó el asa de vidrio se sumergió en el alcohol y se flameó para que se esterilice.
- Con las pipetas automáticas se colocaron 20µL y 100µL de cada una de las muestras de agua termal en los agares respectivamente.
- Se realizó posteriormente la siembra con el asa de vidrio en los agares y se procedió a extender la muestra en la superficie.
- Las cajas Petri sembradas fueron incubadas a 35°C por 24 horas o más dependiendo del crecimiento bacteriano.
- Se observó el crecimiento, las características y se realizó el conteo de las UFC en cada uno de los agares y se realizó la interpretación de los resultados. (Laboratorios Britania S.A., 2015) (Becton Dickinson, 2013) (Laboratorios Britania S.A., 2010) (Becton Dickinson, 2013)



Figura 2-4: Siembra en placas 3M y agares eosina y manitol

Realizado por: BENAVIDES Cyntia, 2017

2.9.6.3 Estabilización de los aislados bacterianos

Aislamiento de las colonias de microorganismos

- Se escogieron algunas colonias de cada placa Petrifilm sembrada (aerobios, mohos y levaduras, *E.coli* y *S. express*) y de las cajas de agares eosina azul de metileno y manitol salado, tomando en cuenta características específicas y representativas de cada colonia como su color, forma y tamaño.
- Se levantó suavemente el film superior de la placa y con la ayuda de un palillo estéril se tomó del gel la colonia seleccionada.
- En una caja de agar Mueller Hinton se traza cuadrados en dependencia de la necesidad y se asigna un código a cada colonia que se va a sacar de las placas Petrifilm así como de los agares eosina azul de metileno y manitol salado.
- En el centro de la cuadrícula del agar Mueller Hinton se inoculó la colonia seleccionada haciendo un ligero toque en el agar.
- Se llevó a incubación de 18 a 24 horas para que exista el crecimiento de las colonias. Pasadas las 24 horas de incubación se tomó una caja nueva de agar Mueller Hinton se dividió en cuadros y se codificó.
- Con un palillo estéril de madera se tomó de la caja Petri que salió de la estufa cada colonia y se la paso a la caja nueva siguiendo el orden de los códigos con un ligero toque y se llevó a incubación nuevamente por 18 a 24 horas; este proceso se lo realizó por al menos cuatro veces más hasta obtener colonias estables. Ver figura 2-5.

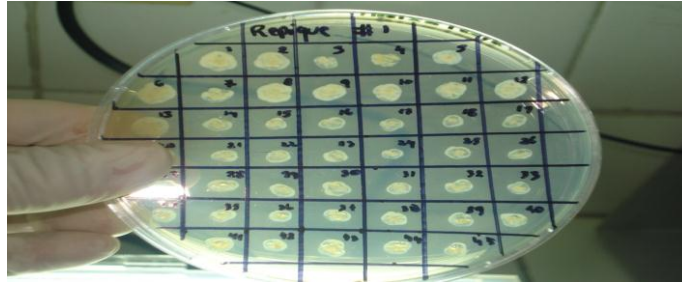


Figura 2-5: Primer repique de las colonias

Realizado por: BEAVIDES Cyntia, 2017

2.9.6.4 Aislamiento por agotamiento de las colonias

Al realizar el ultimo repique de las colonias, se logró la estabilidad de todos los clones obtenidos, se seleccionaron una representación tomando en cuenta las características peculiares y representativas para realizar el aislamiento por agotamiento como se indica en la figura 2-6, de esta forma poder obtener clones puros.

Metodología

- Se esterilizó el asa de platino en la llama del mechero, se dejó enfriar y se tomó una muestra de cada uno de los clones que se desea reaislar
- En una caja Petri con agar Mueller Hinton se codifico y cerca del mechero se realiza de 3 a 4 estrías a un lado de la caja, se quemó el asa de platino, se dejó enfriar, se giró la caja Petri y a partir de la última estría anterior se realizaron estrías nuevas.
- Se quemó nuevamente el asa de platino, se dejó enfriar y se repitió por última vez este proceso, se quemó el asa de platino, se dejó enfriar y a partir de la última estría se hace una cola hacia el centro de la caja Petri.
- Al finalizar la siembra por agotamiento se cierra la caja Petri y se lleva a la estufa a incubarse por 18 a 24 horas a una temperatura de 35°C
- Pasado este tiempo se verificó el crecimiento de las colonias que se aislaron y de estas se tomó una muestra y se hizo un repique en una caja nueva de agar Mueller Hinton. A partir de estas colonias aisladas se realizaron los ensayos posteriores.

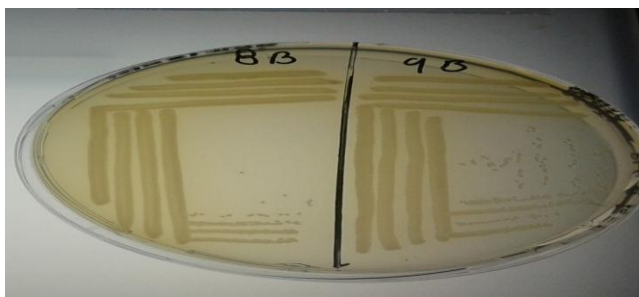


Figura 2-6: Crecimiento de siembra por agotamiento de estrías

Realizado por: BENAVIDES Cyntia, 2017

2.9.6.5 Descripción macroscópica de la morfología de los aislados bacterianos crecida en agar *Mueller Hinton*

Se realizó la descripción macroscópica de las colonias observando las siguientes características:

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

2.9.6.6 Tinción Gram de las colonias puras Aisladas.

Se realizó la tinción Gram para observar si los clones aislados se encuentran puros, es decir ver si tenemos la presencia de cocos o bacilos Gram (+) o Gram (-)

- En una placa portaobjetos limpio y desengrasado se colocó una gota de suero fisiológico.
- Se procedió a tomar con el asa de platino previamente esterilizada la colonia,
- Resuspendió y posteriormente se fijó la muestra a la placa con la ayuda de un mechero.
- Se utilizaron cuatro reactivos para la tinción de Gram: cristal violeta, lugol, alcohol- cetona y safranina durante un minuto a excepción del alcohol-cetona (30 segundos).

- En cada adición de reactivo se enjuagó con agua y se dejó secar.
- Posteriormente se llevó la placa al microscopio para ser observado con el lente de 100x (García, et al., 1997, p. 23)

2.9.6.7 Pruebas Bioquímicas para la identificación bacteriana

A los aislados bacterianos se les realizó una serie de pruebas para su identificación

Prueba de la Oxidasa.

- Para la realización de esta prueba el clon debió tener un crecimiento de 18 a 24 horas de con el fin de evitar falsos-positivos.
- Se colocó una porción de la tira de oxidasa en una caja Petri, con la ayuda de una pipeta Pasteur colocamos una gota de agua destilada estéril.
- Con un palillo de madera estéril tomamos una pequeña cantidad de muestra y colocamos sobre la tira de oxidasa. (Álvarez, 1995, p135)

Interpretación de los Resultados

Se observó si existe o no presencia de un color violeta a negro el cual fue interpretado como reacción positiva, si se ejecutaba hasta 30 segundos de haber aplicado la colonia como se indica en el gráfico. (Álvarez, 1995, p135)

Prueba de la Catalasa.

- Previamente se colocó en una placa portaobjetos agua oxigenada.
- Con la ayuda de un palillo esterilizado se cogió una pequeña cantidad de la colonia la cual se adicionó en la placa preparada con peróxido de hidrógeno al 30% (agua oxigenada). (Álvarez, 1995, p.115)

Interpretación de los resultados.

La formación inmediata de burbujas es considerada prueba positiva, si no existe la formación es negativa (Alvarez, 1995, p.115)

- Catalasa (+): *Staphylococcus aureus*, la familia *Micrococcaceae*.
- Catalasa (-): *Streptococcus spp* y *Enterococcus spp*. (Granados y Villaverde, 2003: p.99)

Prueba de oxidación fermentación.

El medio utilizado para la prueba de óxido-fermentación es Hugh-Leifson, O-F.

Para preparar el medio de cultivo se procedió de la siguiente manera:

- En una canastilla de papel aluminio se pesó la cantidad necesaria del medio de cultivo.
- En un matraz Erlenmeyer se colocó una cantidad adecuada de agua destilada y el medio de cultivo que se pesó.
- Se añadió la glucosa previamente hecho el cálculo, por cada 100mL 1 g; respectivamente en el matraz con el agua y el medio
- Se agitó constantemente hasta lograr la disolución del contenido del matraz en caliente haciendo tres ebulliciones.
- Se colocó el medio en tubos de 10mL y se repartió 7mL aproximadamente del medio
- Se llevó a la autoclave por 30 minutos a 121°C, se dejó enfriar y retiro el medio. (Universidad Técnica Federico Santa María, 2011)

Procedimiento de la prueba de prueba con agar OF se hizo de la siguiente manera:

- Para cada colonia se utilizó 2 tubos de medio de cultivo.
- Se codificaron los tubos de cada una de las colonias.
- Se sembró por picadura con la aguja de inoculación previamente esterilizada hasta la mitad del medio.
- En uno de los tubos se colocó un tapón de vaselina con el fin de crear un ambiente de anaerobiosis y el otro quedó expuestos al aire (aerobiosis).
- Los dos tubos se incubaron a 35°C durante 14 días, tiempo en el cual fueron observados diariamente y anotados los cambios de color. (Álvarez, 1995, p.134)

Interpretación de los resultados

- ❖ **Microorganismos Oxidativos:** Producen una reacción ácida sobre el tubo abierto ocasionado viraje de color verde a amarillo.
- ❖ **Microorganismos Fermentadores:** Producen una reacción ácida en el tubo con y sin parafina ocasionando un viraje de color verde a amarillo
- ❖ **Microorganismos Inertes:** No se evidencian cambios en ninguno de los dos tubos. (Rodríguez, et al., 2005, p. 275)

Siembra en Agar sangre e identificación de los tipos de hemolisis.

- Se preparó agar sangre y se codificó respectivamente
- Se tomó un clon bacteriano desde la caja de agar Mueller Hinton con el asa previamente esterilizada y se sembró por agotamiento de estrías en la superficie del agar
- Una vez sembrado el clon bacteriano se llevó a incubar por 24 horas a 35° C
- Pasado este tiempo se observó si existe alrededor de las colonias la formación de hemolisis y sus características
- Se reportó los resultados obtenidos de cada uno de los microorganismos. (Álvarez, 1995, pp.124-125)

2.9.6.8 Identificación de cocos Gram positivos

Fermentación y crecimiento en agar Manitol Salado

- Se realizó la siembra dentro de la cámara de flujo laminar con la presencia del mechero encendido, esterilizando el asa previamente, se tomó un clon bacteriano de agar Mueller
- Se inoculó en agar Manitol salado mediante estrías continuas.
- Se llevó a incubación la caja Petri por 18 a 24 horas a temperatura de 35°C. (Becton Dickinson, 2013)

Interpretación de los resultados:

- *Staphylococcus aureus*: Crecimiento de colonias y fermentación del medio, cambio de color de rojo a amarillo.
Staphylococcus epidermidis: Crecimiento colonias y no fermenta el medio. (Laboratorios Britania S.A., 2015) (Becton Dickinson, 2013)

Prueba de la coagulasa

- En tubos tapa celeste se procedió a extraer sangre, se agito suavemente para homogenizar y evitar que la sangre se coagule
- Por centrifugación durante 5 minutos a 300 revoluciones se obtuvo plasma citratado
- Se extrajo el plasma con la ayuda de una pipeta automática y se pasó a un tubo pequeño estéril.
- Se codificaron tubos estériles de acuerdo al número de muestras para realizar el ensayo
- Se añadió 0,5mL de plasma a cada tubo con la pipeta automática
- Se colocó un clon bacteriano aislado con el asa estéril y se introdujo dentro de cada tubo, se homogenizo suavemente.
- Se llevó a incubación de 35° C los tubos semi tapados durante 2 horas, observando los cambios de los tubos cada 30 minutos las 4 primeras horas para observar o no la presencia de coagulo.
(Álvarez, 1995, pp.117-118)

Interpretación de los Resultados

Sera una prueba positiva si pasadas de 3 a 4 horas el plasma forma un coagulo de manera firme incluso cuando se incline el tubo, sin embargo algunas bacterias necesitan 24 horas de incubación, pues producen menor cantidad de coagulasa. Figura 2-7 (Clavell, 2009) (Álvarez, 1995, p.118)

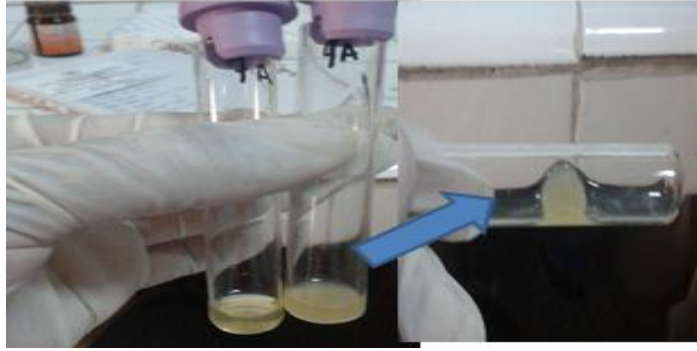


Figura 2-7: Resultado de coagulasa positiva (derecha), coagulasa negativa (izquierda)

Realizado por: BENAVIDES Cyntia, 2017

Crecimiento en caldo Hipersalino al 6.5%

Esta prueba permite conocer si los microorganismos son capaces de crecer en medios de cultivo con cloruro de sodio en una concentración del 6.5%, separa las especies de *Enterococcus* de los *Streptococos*

- Se preparó el caldo soya tripticasa al cual se le añadió cloruro de sodio hasta alcanzar la concentración de 6.5 gramos por cada 100mL.
- Se colocó en cada tubo 3mL del caldo
- Se codificó respectivamente a cada tubo
- Se llevó a esterilización por 30 minutos a 35°C
- Con el asa estéril se toma una colonia bacteriana y se inocula el caldo. (Álvarez, 1995, p.118)

Interpretación de Resultados.

Se reportará como prueba positiva si el caldo presenta turbidez, lo que nos indica crecimiento del microorganismo, de lo contrario se reportará como prueba negativa (Álvarez, 1995, p.119)

Pruebas de identificación bacteriana por sensibilidad o resistencia a los antibióticos ácido nalidíxico 30ug, bacitracina 0.04U, optoquina 5ug, y novobiocina 5ug.

- Se colocó 1,5mL de suero fisiológico en un tubo de vidrio estéril previamente codificado.
- Se tomó una colonia procedente de agar Mueller Hinton con un hisopo estéril y se obtuvo una suspensión parecida a la densidad de la escala 0.5 de McFarland
- Se agitaron los tubos hasta homogenizarlos, se compararon con la escala McFarland siendo observados en una superficie clara y contra una línea negra
- Con otro hisopo se tomó una pequeña cantidad de la suspensión bacteriana, por rotación del hisopo se eliminó el exceso de las paredes internas del tubo
- Se sembró en una caja Petri de Mueller Hinton, se realizó estrías en toda la superficie del agar pasando dos veces el hisopo en forma circular por todos los bordes del agar
- Se dejó las cajas Petri en reposo por aproximadamente 10 minutos
- Se tomó una pinza metálica y se llevó a la llama del mechero para esterilizarla-
- Con la pinza metálica estéril se tomaron los discos de los antibióticos y se colocaron en la superficie de del agar inoculado.
- Se hizo una ligera presión de cada uno de los discos sobre el medio de cultivo
- Se dejó en reposo la caja Petri por uso minutos y se colocó de lado contrario
- Se llevó a incubar a 35° C por 18 a 24 horas
- Se observó la presencia o ausencia del halo de inhibición de crecimiento bacteriano y se lo midió.
- Se comparó los diámetros obtenidos con los estándares para ver si los microorganismos de estudio son sensibles o resistentes (Álvarez, 1995, pp. 113-134)

También para la identificación de cocos se realizó la siembra de las colonias escogidas en medio kligler y urea con el procedimiento que se indicara en la prueba de identificación de bacilos Gram negativos

2.9.6.9 Pruebas utilizadas para la identificación de Bacilos Gram Positivos.

Hidrólisis de Gelatina

El medio utilizado para la hidrólisis de gelatina y su forma de preparación se detalla en la tabla 2-1

Tabla 2-1: Preparación y composición de Agar utilizado para la hidrólisis de gelatina

MATERIALES	COMPOSICION
Extracto de carne 3,0 g	La preparación del medio se efectuó de la misma manera que para la hidrólisis del almidón exceptuando el ajuste de pH que debió ser de 7,2.
Gelatina 30,0 g	
Agar 12,0 g	
Agua destilada 1000mL	

Fuente: Andueza, 2008

Se preparó 100mL de cloruro mercúrico ácido realizando el siguiente procedimiento:

- Se colocó una pequeña cantidad de agua destilada en un balón de aforo de 100mL
- Se pesó 15 gramos de cloruro mercúrico en una canastilla de papel aluminio.
- Se añadió el cloruro mercúrico al balón de aforo
- Se midió 20mL de ácido clorhídrico concentrado con la ayuda de una pipeta volumétrica y por las paredes del balón se virio poco a poco
- Se realizó una ligera agitación hasta lograr la disolución del cloruro mercúrico
- Se añadió agua destilada hasta llegar a la línea de aforo del balón. (Clavell, 2009)

Esta prueba se realizó siguiendo los siguientes pasos:

- Con el asa estéril se tomó un clon bacteriano desde el agar Mueller Hinton
- En el agar gelatina se inoculo el microorganismo mediante estrías.
- Se llevó a incubación por 48 horas a 35°C, pues el crecimiento de la colonia fue bueno en este tiempo
- Encima de la colonia obtenida se colocó unas gotas de cloruro mercúrico, se observó y reporto los resultados. (Clavell, 2009)

Interpretación de los Resultados

Se reportara como positivo si un microorganismo es capaz de hidrolizar la gelatina si alrededor del inoculo hay la presencia de un halo incoloro, la prueba ase reportara como negativa si alrededor del

inoculo se forma un precipitado blanco, que da como producto del reactivo con la gelatina (Universidad Técnica Federico Santa María, 2011) (Clavell, 2009)

Hidrolisis del Almidón

Los componentes y forma de preparación de este medio se detallan en la tabla 2-2

Tabla 2-2. Composición y preparación del Agar utilizado para la hidrólisis del Almidón.

MATERIALES	PREPARACION
Extracto de carne 3,0 g	En el agua destilada se procedió a disolver con la ayuda de calor todos los componentes. Se esterilizó en autoclave a 121° C durante 20 minutos finalmente en cada caja Petri se distribuyó 20mL.
Almidón soluble 10,0 g	
Agar 12,0 g	
Agua destilada 1000mL	
Ajustar el pH a 7,5	

Fuente: Andueza, 2008

Esta prueba se realizó de la siguiente manera:

- Con el asa estéril se tomó una colonia bacteriana de agar Mueller Hinton y se inoculo en este agar.
- La colonia inoculada en el agar almidón fue por el método de siembra por estrías.
- Se llevó a incubación por 48 horas a 35° C, pues hubo buen crecimiento bacteriano.
- Se roció lugol encima de la colonia, se observó los resultados para ser reportados. (Universidad Técnica Federico Santa María, 2011) (Álvarez, 1995, p.111)

Interpretación de los Resultados

Se reportara como amilasa positivo si alrededor del inculo se forma un halo incoloro, si hay la presencia de un color azul pardo alrededor del inculo el microorganismo es amilasa negativo, pues al no poseer la enzima no podrá hidrolizar el almidón. (Universidad Técnica Federico Santa María, 2011) (Álvarez, 1995, p.111)

Para la identificación de bacilos Gram positivos también se realizó la siembra en agar manitol salado, eosina azul de metileno y MacConkey con el procedimiento ya indicado, también se realizaron pruebas bioquímicas, de las cuales sus procedimientos se detallan a continuación

2.9.6.10 Identificación de Bacilos Gram Negativos

Crecimiento en agar Eosina Azul de Metileno

- Con el asa de platino estéril se tomó un clon bacteriano de agar Mueller Hinton
- Se sembró en la superficie del medio mediante estrías
- Se incubo la caja Petri a 35° C por 18 a 24 horas.
- Pasado este tiempo se observaron las colonias y se realizó el reporte respectivo. (Laboratorios Britania S.A., 2010) (Becton Dickinson, 2013)

Crecimiento en agar MacConkey

- Con el asa de platino previamente estéril se tomó una colonia del agar Mueller Hinton
- En la superficie del medio se sembró por estrías
- Se incubo la caja Petri a 35° C por 18 a 24 horas
- Se reportó lo observado de cada una de las colonias
- Se observó las características de las colonias y se reportó los resultados.(Laboratorios Britania S.A., 2015)

Crecimiento en agar *Salmonella-Shigella*

- Con el asa previamente esterilizada se tomó un clon bacteriano de agar Mueller Hinton
- En la superficie del medio se procedió a sembrar por el método de estrías.
- Se incubó la caja Petri a 35°C de 24 a 48 horas.
- Se observó las características de las colonias y se realizó la interpretación respectiva. (Granados y Villaverde, 2003: p.27) (Laboratorios Britania S.A., 2015)

Prueba en agar Kligler

- Con la aguja previamente esterilizada se tomó un clon bacteriano de agar Mueller Hinton
- En el centro del agar Kligler se realizó una punción dejando 1,5cm desde el fondo y se retiró la aguja siguiendo el mismo camino por que el ingreso.
- En la superficie del pico del medio se sembró por estriamiento en forma de S o zig- zag
- Los tubos fueron semi tapados y se incubaron a 35° C por 18 a 24 horas (Álvarez, 1995, p.141)

Interpretación de los Resultados

El medio Kligler es de color rosado o salmón, luego de que se ha realizado la siembra del inoculo e incubado en el tubo pueden generarse los siguientes resultados que se muestran en la tabla 2-3

Tabla 2-3: Resultados del crecimiento bacteriano del microorganismo en agar hierro de Kligler.

Fermentación de glucosa	Vira a amarillo el fondo del tubo
Fermentación de lactosa	Vira a amarillo la superficie o pico de flauta del tubo
Fermentación de glucosa/lactosa	Vira a amarillo todo el tubo
Producción de ácido sulfhídrico	Precipitado negro del sulfuro ferroso

Prueba del citrato

- Se tomó un clon bacteriano con una aguja de inoculación estéril
- Se realizó la siembra en el pico de flauta por estriamiento o zig-zag
- Se incubaron los tubos semi tapados a 35° C por 18 a 24 horas (Álvarez, 1995, p.116)

Interpretación de los Resultados

Si existe crecimiento y el medio toma un color azul la prueba del citrato es positiva, si no hubo crecimiento y el medio continua de color verde la prueba del citrato es negativa (Álvarez, 1995, p.116)

Prueba de la urea

- Con una aguja estéril se tomó un clon bacteriano del agar Mueller Hinton
- Se sembró en forma de So zig- zag por estriamiento solo en el pico de flauta
- Se incubaron los tubos semi- tapados a 35°C por 18 a 24 horas (Laboratorios Britania S.A., 2010) (Universidad Técnica Federico Santa María, 2011) (Álvarez, 1995, p.142)

Interpretación de los Resultados

La prueba es positiva si se genera un cambio de color de medio a un rojo violeta y si el tubo sigue de la coloración inicial la prueba es negativa (Universidad Técnica Federico Santa María, 2011) (Álvarez, 1995, p.142)

Medio SIM

- Con una aguja de inoculación previamente estéril tomamos un clon bacteriano del agar Mueller Hinton
- Se realizó una punción en línea recta en el centro del tubo hasta llegar al fondo y se acola aguja por el mismo camino que ingreso.
- Se incubaron los tubos semi-tapados a 35° C por 24 horas
- A las 24 horas de incubación se añadió al tubo de 3 a 5 gotas de reactivo de Kovacs agitando suavemente.
- Los resultados obtenidos de movilidad, Indol, ácido sulfhídrico fueron observados y reportados. (Granados y Villaverde, 2003: p.133)

2.9.6.11 Antibiograma

Para la realización de esta prueba se utilizó el método de difusión de agar y se realizó lo siguiente:

- ❖ Se preparó agar Mueller Hinton.
- ❖ En tubos de vidrio estéril y codificado colocamos 1.5 mL de suero fisiológico.
- ❖ Con la ayuda de un hisopo estéril se toman colonias de (2 a 4) en dependencia del tamaño y se colocan en el tubo para realizar una suspensión bacteriana que se asemeje al estándar McFarland 0.5 en turbidez.
- ❖ Se tomó un poco de esta suspensión con el hisopo, eliminando los excesos.
- ❖ Se realizó la siembra en toda la superficie del agar haciendo rotar la caja a 60°C cada vez en diferentes direcciones y dando vueltas alrededor de los bordes del agar.
- ❖ Con la pinza metálica estéril se tomó un disco de papel que contienen una solución de antibiótico y lo colocamos en la superficie del agar Mueller Hinton poniendo distancia considerable entre un disco y otro.
- ❖ Se hizo una ligera presión al disco colocado y dando unos toquecitos suavemente fijamos bien

- ❖ Se colocó la caja Petri con los discos de antibiótico en la estufa a 35° C y se incubó por 24 horas, pasado este tiempo se midió el diámetro de los halos de inhibición en mm formados para cada antimicrobiano y microorganismo.
- ❖ Los diámetros obtenidos(figura 8-2) fueron comparados con las tablas del National Committee for Clinical Laboratory Standards(NCCLS) para poder reportar como sensible, intermedio, moderadamente sensible o resistente (Pedrique, 2002) (Procedimientos en Microbiología Clínica, 2000)

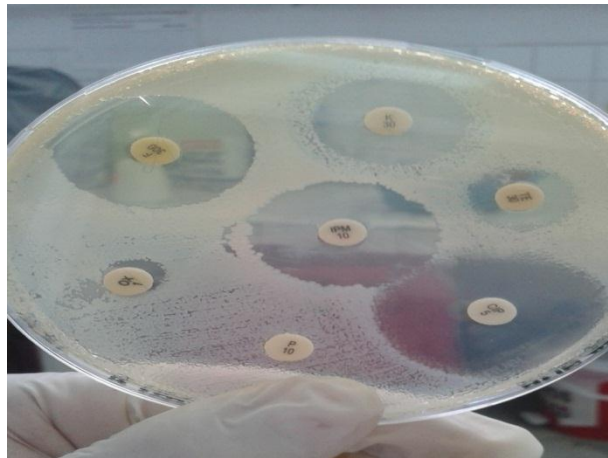


Figura 2-8: Antibiograma con sensibilidad (halo) y resistencia microbiana

Realizado por: BENAVIDES Cyntia, 2017

CAPITULO III

3. MARCO DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los parámetros físico- químicos obtenidos, temperatura y pH de las aguas termales de Cunuyacu, fueron tomados con un termómetro y tiras reactivas de pH, el recuento de las colonias que crecieron en las placas 3M Petrifilm, agar Eosina Azul de Metileno y agar Manitol Salado, se procedió a sacar la media aritmética, varianza y desviación estándar para la obtención de resultados microbiológicos.

3.1 Parámetros Físico-químicos medidos in situ del agua termal de Cunuyacu

Tabla 3-1: Parámetros Físico-químicos del muestreo del agua termal de Cunuyacu

SITIOS MUESTREADOS	PARÁMETROS				
	Color	Temperatura del agua(° C)	pH	Altitud (m)	Temperatura ambiente(° C)
M1	Amarillo claro	24	6	4123	18
M2	Amarillo claro	26	6		
M3	Amarillo ámbar y con grasa	23	7		
M4	Amarillo claro	26	6		
PROMEDIO		24.75	6.25	4123	18

Realizado por: BENAVIDES Cyntia, 2017

En la tabla 3-1 se puede observar que los valores de temperatura obtenidos en los puntos de muestreo están entre 24-26° C, la temperatura ambiente fue de 18 °C, se puede afirmar que se realizó la evaluación de aguas termales, de acuerdo a lo dicho por Burbano en el año 2015, quien considera un agua como termal a aquella cuya temperatura sea superior en al menos 5° C a la temperatura ambiente.

La temperatura promedio de las aguas termales encontradas en este trabajo estuvo por encima de la reportada en un estudio realizado por Tamayo en el año 2012, en el que se reporta 22° C mientras que el valor obtenido en nuestro análisis fue de 24° C, el incremento en el valor de temperatura observado puede deberse a factores ambientales, a la variabilidad estacional o a cambios inherentes a la fuente termal.

Es importante indicar que esta fuente no ha sido estudiada por el INAMI, por lo que no se posee valores de referencia. La temperatura tiene relación con el tipo de terreno, naturaleza de las rocas, gradiente térmico y de los fenómenos magmáticos. (Burbano, 2015, p.115)

De acuerdo a los valores de temperatura reportados en este estudio y según los estudios de Tamayo (2012, pp 92-95) las aguas de Cunuyacu se clasifican como hipotermas, pues se encuentran en un rango de temperatura entre 20 y 30 °C.

Para las muestras M1, M2 y M4 la temperatura fue mayor, pues estas muestras fueron tomadas de los puntos de donde emerge el agua, la muestra M3 reportó la temperatura más baja pues es la que está en la piscina, esto puede deberse al trayecto del agua y a las condiciones del clima.

El crecimiento microbiano se relaciona directamente con la temperatura, es decir la temperatura baja inhibe el crecimiento, la máxima ocasiona muerte celular y la óptima permite que exista un crecimiento máximo de bacterias, entonces se puede decir que en estas aguas termales existe un ambiente óptimo para que se desarrollen microorganismos, la temperatura de crecimiento de estos oscila entre los 25 y 40° C (Escudero, 2012)

Los valores de pH que se indican en la tabla 1-3 de las muestras de las aguas termales nos dieron un promedio de 6.25, comparándolas con estudios similares acerca de las propiedades físico-químicas del agua termal que se han realizado en otros Balnearios como en el de la villa de Olmedo en donde Torija et al. (2015, p.38) reporta un valor de pH 8.2

EL pH del agua puede tener interferencia en procesos químicos y biológicos, el pH fue medido al momento de la toma de las muestras. (Porrás, 1985, p 25). El pH condiciona la supervivencia y el crecimiento bacteriano, cada microorganismo tiene un rango de pH óptimo para vivir, en las aguas termales de Cunuyacu pueden crecer microorganismos neutrófilos. (Escudero, 2012)

Otro estudio realizado en Baños de Jaraba Aragón Torija y colaboradores (2004, pp.502-503) determinaron un pH cercano a 6.5. (Burbano, 2015, p.115)

Otro factor analizado fue el color del agua y en los puntos de muestreo M1, M2 y M4 el agua presentaba un color amarillo claro, en el punto M3 el agua era de color amarillo ámbar y contenía unas manchas que asemejaban a grasa. La coloración del agua está dada en dependencia a la presencia de minerales disueltos en ella como hierro y azufre. Este color particular de estas aguas llega a darle la apariencia de ser doradas. (Tamayo 2012,)

3.2 Recuento de bacterias aerobias mesófilas encontradas en las aguas termales de Cunuyacu

Tabla 3-2: Recuento de bacterias aerobias mesófilas presentes en las aguas termales de Cunuyacu

SITIOS DEL MUESTREO	Primera Réplica UFC/mL	Segunda Réplica UFC/mL	Media	Varianza	Desviación estándar
M1	3	4	3,5	0,5	0,70710678
M2	6	10	8	8	2,82842712
M3	28	34	31	18	4,24264069
M4	7	8	7,5	0,5	0,70710678
Total	48	56	12,25	27	8,48528137

Realizado por: Benavides Cyntia, 2017

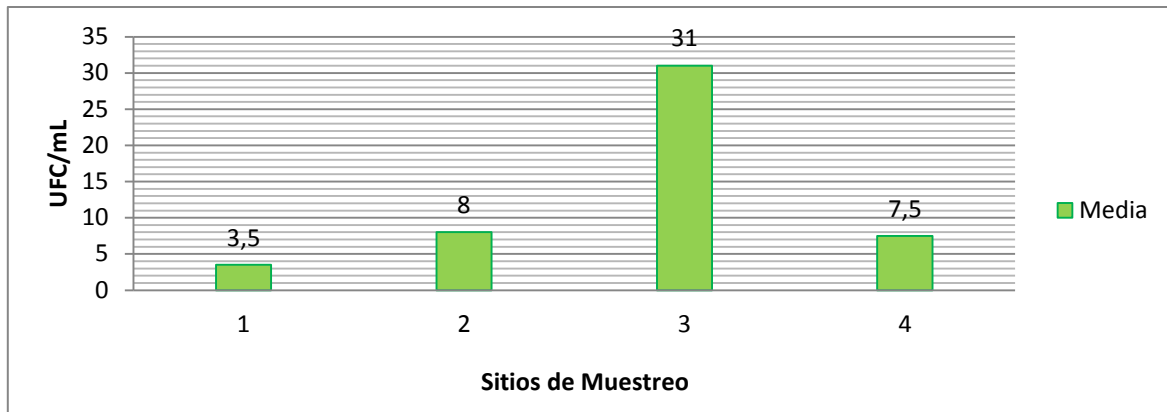


Gráfico 1-3: Promedios del recuento de bacterias aerobias mesófilas de los sitios muestreados de las aguas termales de Cunuyacu

Realizado por: BENAVIDES Cyntia, 2017

En la tabla 3-2y en la figura 1-3 se observan los resultados que indican una importante variabilidad dependiendo del lugar de recolección, M1 (fig. 1-3) que corresponde a uno de los sitios de surgencia mostró el menor número de bacterias (3 y 4 UFC/mL), mientras que M3 (tabla 3-2) que corresponde a un área de reposo del agua mostro el mayor valor (28 y 34 UFC/mL). Esto podría indicar que las bacterias aisladas corresponden a contaminantes procedentes del ambiente que rodea la fuente.

Las aguas termales poseen dos grupos de microorganismos bien identificados, las bacterias autóctonas, que dependen de las propiedades físicos químicas del agua, nutrientes, oxigenación y el otro tipo de bacterias que son las alóctonas que tienen su procedencia del suelo, vegetación, heces fecales de animales o humanos, animales muertos, etc. La cantidad de bacterias varía en relación al tipo de agua, la cantidad de sales inorgánicas, enturbiamiento y temperatura. (De la Rosa y Mosso, 2000, p. 153-154) (Escudero, 2012)

Según Andueza y colaboradores en el año 2014, indica que la presencia de un alto número de bacterias aerobias mesófilas son indicadores de contaminación, las condiciones del agua son indispensables, la presencia de este tipo de bacterias en cantidades grandes demuestra posibles problemas de contaminación del agua, es decir de bacterias de origen patógeno son los posibles causantes de la trasmisión de enfermedades como amebiasis, salmonelosis, shigelosis, etc.

El Código Sanitario Mexicano menciona que el recuento de aerobios mesófilos no debe sobrepasar de 200 colonias por cada mL de agua, cumpliéndose en este estudio al realizar el recuento en cada punto muestreado. (Andueza, 2014) (Técnicas para la enumeración de microorganismos, 2012)

Los resultados obtenidos pueden deberse a que el agua está a la intemperie o que está en contacto directo con la vegetación propia del lugar. La existencia de bacterias aerobias mesófilas en todos los puntos de muestreo esto podría indicar que estas bacterias pueden proceder del ambiente, de las personas y animales que frecuentan el lugar

3.3 Recuento de *Escherichia coli* y los Coliformes totales que se encuentran presentes en las aguas termales de Cunuyacu.

Tabla 3-3: Recuento de *Escherichia coli* y Coliformes totales en los puntos de muestreo de las aguas termales de Cunuyacu

SITIOS DEL MUESTREO	Número de muestra	UFC/mL		Varianza	Desviación estándar
		<i>E. coli</i>	Coliformes totales		
M1	M1.1	0	0	0	0
	M1.2	0	0		
M2	M2.1	0	1	2	1,414
	M2.2	0	3		
M3	M3.1	1	8	2	1,414
	M3.2	2	5		
M4	M4.1	0	0	0	0
	M4.2	0	0		
Total		3	17	4	2.828

Realizado por: BENAVIDES Cyntia, 2017

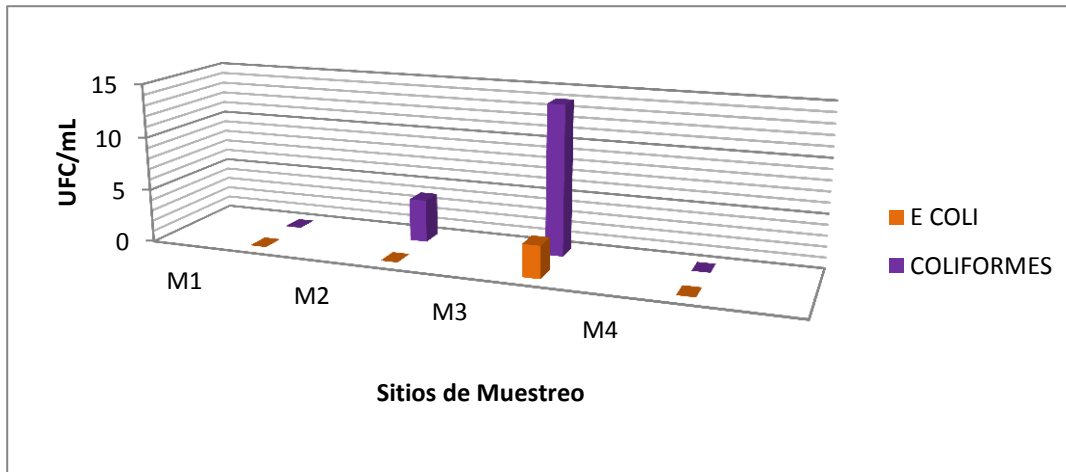


Gráfico 2-3: Promedio del recuento de *Escherichia coli* y Coliformes totales de los puntos de muestreo de las aguas termales de Cunuyacu

Realizado por: BENAVIDES Cyntia, 2017

En el gráfico 2-3 y en la tabla 3-3 se observan los resultados obtenidos para el número de coliformes presentes en las fuentes termales de Cunuyacu. Se observa una significativa variabilidad en el valor obtenido, M2 que corresponde a uno de los sitios donde emerge el agua el cual muestra un número pequeño de coliformes (1 y 3 UFC/mL), mientras que M3 que corresponde al sitio donde el agua permanece en reposo existe un valor alto de coliformes (5-8 UFC/mL) y además tiene la presencia de *Escherichia coli* (1y 2 UFC/mL).

En las muestras M1 y M4 no existe la presencia de *Escherichia coli*, ni de coliformes totales, M3 mostro el mayor número de coliformes como era de esperarse, fortaleciendo nuestra afirmación de que estas bacterias son alóctonas y que en algunos casos podrían proceder del ambiente, de las heces de humanos y animales.

La presencia de coliformes es un aspecto que se toma en cuenta para determinar contaminación, la presencia de los géneros (*Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*) para el grupo de coliformes totales mientras que para el grupo de coliformes fecales están *Escherichia coli*, algunas especies de *Citrobacter*, estas bacterias son más resistentes que las bacterias patógenas intestinales. (Vázquez, 2013)

Bacterias que se alojan a nivel de intestino como es el caso de *Escherichia coli*, uno de los principales indicadores de contaminación fecal, las condiciones como la temperatura, luz solar, la presencia de otras bacterias que habitan en el mismo sitio y la composición química del agua hacen que esta bacteria no sobreviva por mucho tiempo por eso en este estudio se ve su presencia en pequeñas cantidades (Vázquez S, 2013)

Según Andueza y colaboradores en el año 2014, la presencia de *E coli* nos indica que existe contaminación fecal, en nuestro estudio la muestra M3.1 mostró la presencia de *E. coli.*, lo cual puede deberse a que este lugar está en contacto directo con la microbiota alóctona que proviene de otros hábitats como es la vegetación, el suelo, animales entre otros que pueden ser los causantes de esta contaminación.

Al igual que lo reportado por de la Rosa M. en el año 2000, para el balneario de Jaraba, nuestros resultados indican que la fuente termal no posee contaminación con heces fecales, sin embargo los valores obtenidos para la muestra M3 indican que existe contaminación fecal procedente probablemente de los humanos o animales que frecuentan la fuente la cual se encuentra en la porción de la piscina (poza), donde el agua se mantiene almacenada con un bajo recambio.

Este hecho a de esperarse porque la fuente es totalmente natural sin ninguna medida de protección, ni de mantenimiento o sanitización. No obstante los resultados indican que si se toman medidas mínimas para proteger la fuente muy probablemente se eliminen las bacterias contaminantes obteniéndose un agua con una calidad microbiológica apta para recreación.

En un estudio realizado por De La Rosa M, en el año 2000 menciona que en las aguas mineromedicinales de uso terapéutico no deben existir bacterias patógenas ni indicadores de contaminación fecal, pues estas aguas no serían aptas para recreación y representarían un importante riesgo sanitario.

3.4 Recuento de *Staphylococcus aureus* presentes en las aguas termales de Cunuyacu

Tabla 3-4. Recuento de *Staphylococcus aureus* en los puntos de muestreo de las aguas termales de Cunuyacu

SITIOS DEL MUESTREO	Primera Réplica UFC/mL	Segunda Réplica UFC/mL	Media	Varianza	Desviación estándar
M1	0	0	0	0	0
M2	0	0	0	0	0
M3	4	2	3	2	1.414
M4	0	0	0	0	0
Total	4	2	3	2	1.414

Realizado por: BENAVIDES Cyntia, 2017

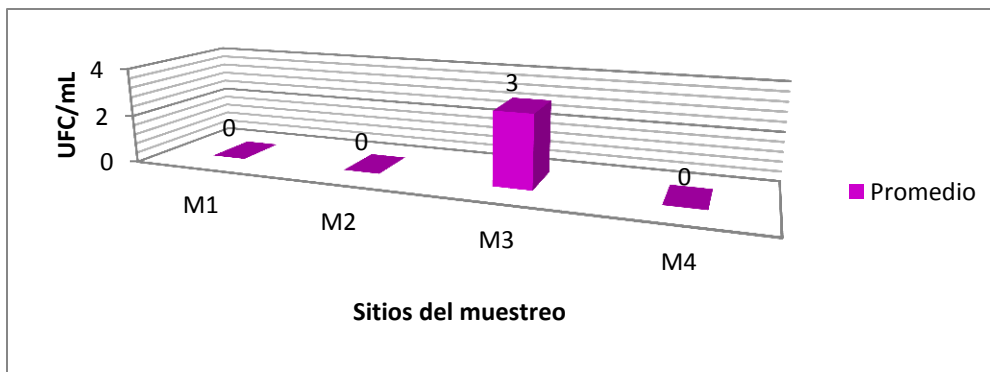


Gráfico 3-3: Promedio del recuento de *Staphylococcus aureus* de los puntos de muestreo de las aguas termales de Cunuyacu

Realizado por: BENAVIDES Cyntia, 2017

En la tabla 3-4 se muestran los resultados obtenidos para el número de *Staphylococcus* presentes en las fuentes termales de Cunuyacu. Para M1, M2 y M4 (graf. 3-3) que son los puntos donde emerge el agua no existe crecimiento (0 UFC/mL), mientras que para M3 que es el punto donde el agua permanece sin recambio tenemos un pequeño valor (4-2 UFC/mL), esto puede deberse a que la fuente es natural y no existe ninguna protección, por lo que está expuesta a factores contaminantes provenientes del medio ambiente, animales y personas que frecuentan este lugar.

El *Staphylococcus aureus* puede formar parte de la microbiota normal en el cuerpo humano pues puede encontrarse en las fosas nasales, piel, axilas y genitales provocando enfermedades. La presencia de esta bacteria resulta patógena en personas que se encuentran inmunodeprimidas como es el caso de personas que se encuentran enfermas, con quemaduras o con infecciones en la piel y que pudieran frecuentar la fuente termal. (Bustos, 2006, p.288) (Alzamora, S, et al. 2004)

En este trabajo no existió crecimiento de *Staphylococcus aureus*, estos resultados concuerdan con un estudio realizado por De La Rosa M, en el año 2014, en el que indican que las aguas mineromedicinales de los balnearios de Jaraba no existen bacterias patógenas como *Staphylococcus aureus*.

El *Staphylococcus aureus* es una bacteria que se encuentra ampliamente distribuida en el ambiente formando parte de la diversidad de los microorganismos propios de las aguas termales, por lo que los resultados obtenidos indican que las aguas de Cunuyacu no son un peligro para la salud de las personas que acuden a este lugar. (Bustos, 2006, pp. 288-289)

Al igual que en este trabajo se realizaron estudios en los manantiales termales de Santa Apolonia del estado de Mérida en Venezuela, en los que revelaron la presencia de *Staphylococcus aureus*, lo cual nos indica que en otras fuentes termales puede haber la presencia de esta bacteria. (Flores, 2009)

3.5 Recuento de Mohos y Levaduras presentes en las aguas termales de Cunuyacu

Tabla 3-5: Recuento de Mohos y levaduras en los puntos de muestreo de las aguas termales de Cunuyacu

SITIOS DEL MUESTREO	Código de la muestra	UFC/mL		Varianza	Desviación estándar
		Mohos	Levaduras		
M1	M1.1	0	0	0,5	0,707
	M1.2	0	1		
M2	M2.1	1	2	2	1,414
	M2.2	0	1		
M3	M3.1	2	4	0,5	0,707
	M3.2	2	5		
M4	M4.1	1	0	0,5	0,707
	M4.2	2	0		
Total		8	13	3,5	3,536

Realizado por: BENAVIDES Cyntia, 2017

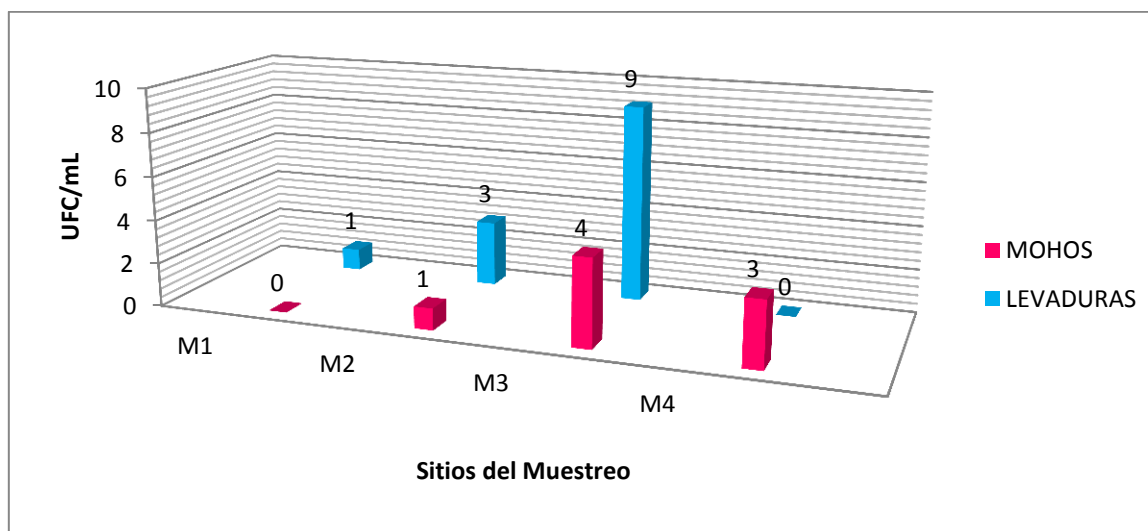


Gráfico 4-3: Promedio del recuento de Mohos y levaduras de los puntos de muestreo de las aguas termales de Cunuyacu

Realizado por: BENAVIDES Cyntia, 2017

En la tabla 3-5 se muestran los resultados obtenidos del número de mohos y levaduras obtenidos de las aguas termales de Cunuyacu.

Estos resultados muestran una importante variabilidad dependiendo del lugar de recolección, M2 y M4 (Graf 4-3) que corresponden a los sitios de surgencia mostraron un número pequeño de mohos (0-1UFC/mL) y (1-2UFC/mL) respectivamente, mientras que como era de esperarse en el punto M3 (Graf 4-3) que corresponde a la piscina (poza) que es un sitio en donde el agua permanece en reposo mostro un mayor valor (4UFC/mL).

Para el caso de las levaduras en M1 y M2 (tabla 3-5) presentan un pequeño número ((0-1UFC/mL) y (1-2UFC/mL), M3 igualmente presenta el mayor valor (4-5UFC/mL). La presencia de mohos y levaduras en las aguas termales de Cunuyacu también va a depender del lugar de recolección de la muestra.

Los resultados obtenidos indican un mínimo crecimiento de mohos y levaduras, por lo que se puede decir que la procedencia de estos pueden provenir de otros hábitats como el suelo, vegetales, animales que están cercanos al lugar donde se encuentran las aguas termales, y que se adaptaron a las condiciones presentes en el agua. (Andueza, 2014)

Los mohos y las levaduras se encuentran bien distribuidos en la naturaleza, por lo que pueden estar presentes en las aguas termales. La presencia de altos valores de este grupo de microorganismos podría indicar problemas de higiene, limpieza o contaminación ambiental. (Giles, 2009). En nuestro caso (tabla -3-5) se observa claramente que existe una reducida cantidad de mohos y levaduras por lo que no representan un riesgo sanitario.

Los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con los estudios de Rosa y Mosso en el año 2000 en los que indican que en las aguas termales minerales existen bajas concentraciones de hongos, en especial los que corresponden a los géneros *Penicillium*, *Aspergillus* y *Alternaria*,

Los hongos no influyen de manera negativa en la calidad sanitaria del agua, existen además estudios de diversos autores que hacen reportes de la presencia de hongos en cantidades muy bajas en sus estudios realizados en fuentes termales.

En el caso de las levaduras los resultados obtenidos en esta investigación coinciden con Mosso et al. (2008, pp. 516-517, quien reporta el aislamiento de levaduras a partir de ambientes acuáticos, algunas de ellas *Cándida spp.*, *Brettanomyces spp.* y *Hansenula spp.*

3.6 Recuento de colonias crecidas en agar Eosina azul de metileno y Manitol salado, como de las colonias que fermentan y no fermentan lactosa y manitol

Tabla 3-6: Recuento de colonias que crecieron y que fermentaron o no lactosa y manitol en cada uno de los agares respectivamente

Sitios del Muestreo	Código de la muestra	UFC/mL			
		Agar Eosina Azul de Metileno		Agar Manitol salado	
		Lactosa (+)	Lactosa (-)	Manitol (+)	Manitol (-)
M1	M1.1	0	0	0	0
	M1.2	0	0	0	0
M2	M2.1	0	0	0	5
	M2.2	0	0	0	4
M3	M3.1	25	72	0	4
	M3.2	28	69	0	7
M4	M4.1	10	17	0	0
	M4.2	13	20	0	0
Total bacterias fermentadoras		76	178	0	20
Total colonias		254		20	

Realizado por: BENAVIDES Cyntia, 2017

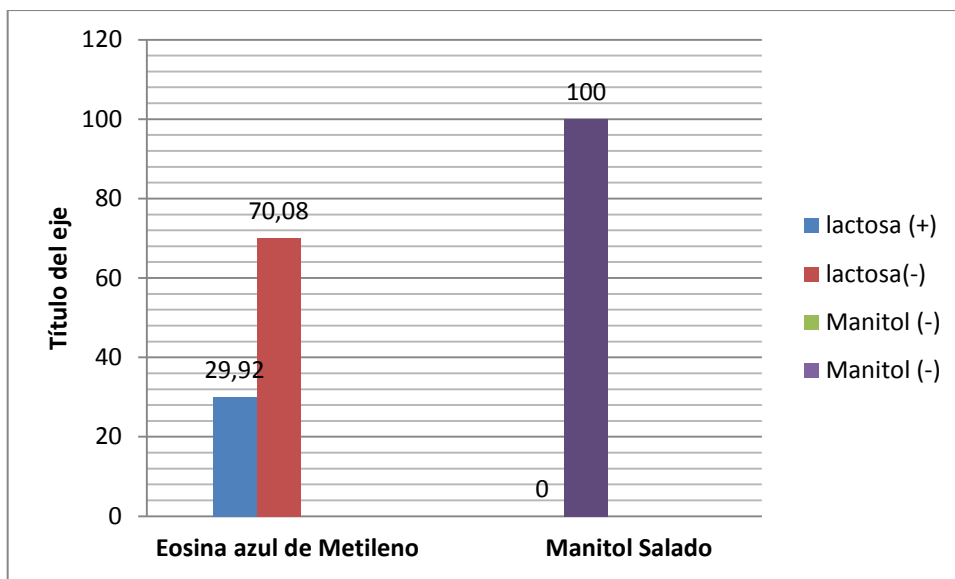


Gráfico 5-3: Porcentaje total de colonias fermentadoras y no fermentadoras en agar eosina azul de metileno y manitol salado

Realizado por: BENAVIDES Cyntia, 2017

La siembra en agar eosina azul de metileno y manitol salado de las muestras de agua termal de Cunuyacu nos permitió ver de manera general la cantidad de colonias que crecieron en estos agares, así como la cantidad de colonias que fermentaron o no lactosa y manitol respectivamente guiándonos en el color obtenido

En la tabla 3-6 se muestra los resultados en los que claramente se ve que hay un predominio de colonias crecidas en agar eosina azul de metileno (254 UFC/ mL) sobre (20 UFC/ mL) que crecieron en manitol.

Las colonias que fermentaron y no fermentaron lactosa corresponden a 254 UFC/mL y de estas 178 corresponden a bacterias no fermentadoras y 76 a bacterias fermentadoras, en manitol salado de las 20UFC/mL ninguna fermentó en este medio (tabla 3-6)

La presencia de colonias fermentadoras de lactosa depende también del lugar de donde provienen las muestras, a pesar de existir un alto número de bacterias en M1 y M2 no existe crecimiento de colonias, en M4 (Graf 5-3) existe un menor número de colonias fermentadoras de lactosa (10-13 UFC/mL), mientras que en M3 hay un número mayor de colonias (25-28 UFC/mL). Esto podría indicar que las bacterias aisladas corresponden a contaminantes procedentes del ambiente que rodea la fuente.

Las colonias que crecieron en el agar eosina azul de metileno son generalmente de la familia *Enterobacteriaceae*, la presencia de estas puede ser del ambiente (suelo, animales, plantas), de las vías respiratorias superiores, de la piel o de la flora intestinal de las personas o animales que visitan este lugar. Las colonias que crecieron en agar manitol salado generalmente pertenecen al género *Staphylococcus* que puede ser procedente de la flora bacteriana de las personas que van a las aguas termales. (Merino, 2010)

La mayoría de colonias que fermentaron lactosa en su mayoría presentaron una periferia rosada con centro oscuro azul, otras colonias eran negras con el verde bilis y brillo metálico lo que hizo presumir la presencia de *Escherichia coli*, las colonias que no fermentaron lactosa eran transparentes que posiblemente podrían pertenecer a los géneros *Salmonella proteus*, *Pseudomonas* o *Shigella*. (Laboratorios Britania S.A, 2010)

3.7 Morfología microscópica de los clones obtenidos y aislados de las aguas termales de Cunuyacu

Para poder determinar la morfología microscópica se realizó una tinción Gram de los 106 clones obtenidos y aislados para ser observados mediante un microscopio óptico con el lente de 100x y aceite de inmersión.

Tabla 3-7: Morfología microscópica de los clones bacterianos aislados de las aguas termales de Cunuyacu

Tinción Gram y Morfología	Primera siembra	Segunda Siembra	Total	Porcentaje
Cocos Gram (+)	37	39	76	67%
Cocos Gram (-)	4	2	6	7%
Bacilos Gram(+)	2	2	4	4%
Bacilos Gram(-)	7	5	12	13%
Clones contaminados	5	3	8	9%

Realizado por: BENAVIDES Cyntia, 2017

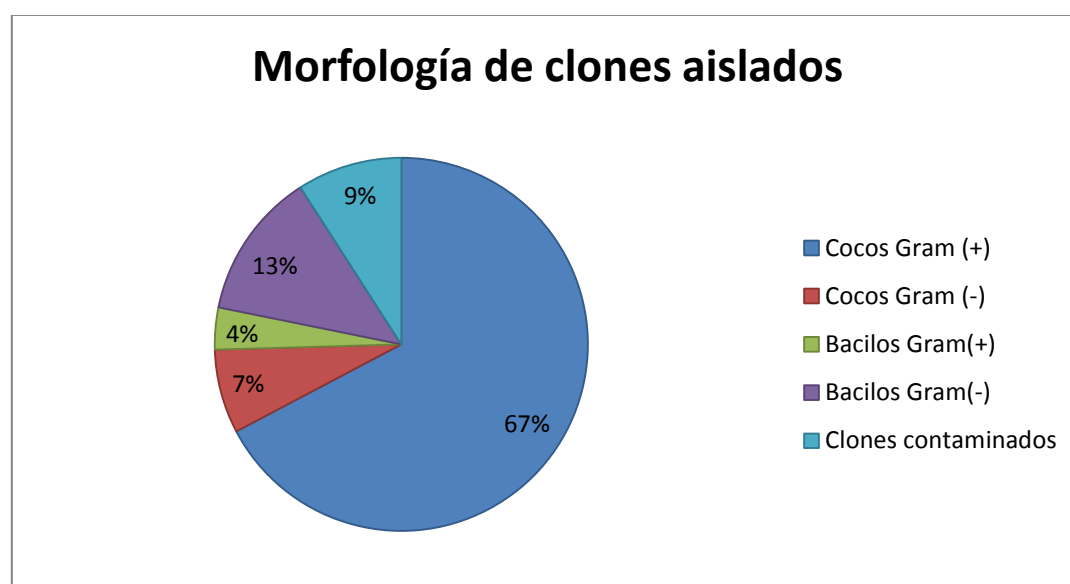


Gráfico 6-3: Porcentaje total de clones bacterianos por tinción Gram y morfología

Realizado por: BENAVIDES Cyntia, 2017

El gráfico 6-3 indica los resultados de los clones aislados según su morfología y por tinción Gram, de acuerdo a estos dos parámetros encontramos una prevalencia de microorganismos Gram positivos con un 71%, para bacterias Gram negativas tenemos 22%, de acuerdo a su morfología tenemos un 74% de cocos y bacilos un 17%, existió un 9% de clones que no lograron ser identificados pues su morfología no era bien diferenciada.

Los resultados de este trabajo son similares a estudios realizados en manantiales termales como es el Balneario de Alicún de las Torres (Granada), en el que se encontró una mayor cantidad de cocos

Gram positivos en un 54.5%, en menor cantidad los bacilos con un 29% y cocos Gram negativos en un 16.4%, lo que nos deja ver que la microbiota de ese lugar es similar al de las aguas termales de Cunuyacu que están constituidas en su gran mayoría de cocos Gram positivos. (Flores, 2013)

Otros estudios realizados en aguas termales muestran que existe un predominio de bacterias Gram positivas, esta diferencia se debe a que las bacterias Gram positivas son más resistentes al calor, en el caso de las aguas termales de Cunuyacu coinciden estos resultados pues hubo un predominio notable de bacterias Gram positivas. (De la Rosa y Mosso, pp. 153-156)

De las 106 colonias bacterianas aisladas de las aguas termales de Cunuyacu se seleccionaron 25 de acuerdo a su forma y color, para luego realizar la identificación de las mismas, de estas encontramos 18 cocos Gram positivos que corresponde a los géneros *Staphylococcus*, *Micrococcus* y *Streptococcus*, 6 bacilos Gram negativos que corresponden a los géneros *Pseudomona*, *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Escherichia* y un bacilo Gram positivo que corresponde al género *Bacillus*.

3.8 Pruebas Bioquímicas para la identificación de Cocos Gram Positivos

Los resultados de las pruebas bioquímicas que se realizaron a los cocos Gram positivos se muestran en las tablas 3-8, 3-9 y 3-10

Tabla 3-8: Pruebas Bioquímicas para la identificación de Cocos Gram Positivos de las aguas termales de Cunuyacu

PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN								
ORIGEN	Código de la cepa	M 3.1	M3.1	M3.1	M3.2	M3.2	M3.2	M3.2
	Número de muestra	1A	3A	7A	12A	4C	9C	18C
	Placa 3M Petrifilm/ Agar	Recuento rápido de aerobios	Recuento rápido de aerobios	Recuento rápido de aerobios	Recuento de <i>E.coli</i> y Coliformes	Recuento de <i>E.coli</i> y Coliformes	Recuento de <i>E.coli</i> y Coliformes	Recuento de <i>E.coli</i> y Coliformes
	Descripción macroscópica de la colonia del Petrifilm o agar (forma, tamaño, borde y color)	Mediana, circular, azul con centro rojo pequeño, bordes lisos	Pequeña redonda, azul, bordes enteros	Pequeña, azul con filo azul bien marcado, bordes lisos	Mediana, morada, con puntos azules, bordes ondulados.	Bien pequeña, puntiforme, rojo claro, bordes enteros	Mediana , azul con punto azules, bordes lisos	Mediana , morada cremosa y bordes ondulados
MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA	Morfología celular	Cocos /racimos	Cocos /racimos	Cocos /racimos	Cocos /racimos	Cocos /cadenas	Cocos /racimos	Cocos /racimos
	Tinción Gram	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
	Catalasa	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
	Oxidasa	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo

PRUEBAS BIOQUIMICAS	OF		Fermentativo	Fermentativo	Fermentativo	Fermentativo	Inerte	Inerte	Inerte
	Agar sangre	Crecimiento	Redonda, blanca transparente, >1mm	Blanca cremosa, redonda , >1mm	Amarilla cremosa, redonda>1mm	Blanca cremosa, redonda, >1mm	Blanca cremosa, redonda, >1mm	Blanca cremosa, redonda, >1mm	Blanca cremosa, redonda, <1mm
		Hemólisis	β	γ	γ	β	γ	β	β
	Agar manitol salado		No fermento ni creció	No fermento ni creció	Crecimiento	No fermento ni creció	No fermento ni creció	No fermento ni creció	No fermento ni creció
	Coagulasa		Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
	Crecimiento en NaCl 6.5%		Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
	KLIGLER	Glucosa	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
		Lactosa	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
Gas		Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	
H ₂ S		Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	
DISCOS DE ANTIBIOTICOS PARA IDENTIFICA	UREA		Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
	Ácido Nalidíxico 30µg		Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Sensible	Resistente	Resistente
	Bacitracina 0.04U		Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente

	Novobiocina 5 µg	Resistente	Sensible	Resistente	Sensible	sensible	Sensible	Sensible
	Optoquina 5 µg	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente
IDENTIFICACION DEL MICROORGANISMO	Género y especie	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Streptococcus viridans</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>

β=Beta hemólisis, γ=Alfa hemólisis, Resistente= sin formación de halo, Sensible =formación de halo de inhibición

Realizado por: BENAVIDES Cyntia, 2017

Tabla 3-9: Pruebas Bioquímicas para la identificación de Cocos Gram Positivos de las aguas termales de Cunuyacu

PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN					
ORIGEN	Código de la cepa	M 3.1	EAM3.1	EAM3.1	MAM3.1
	Número de muestra	21B	14 A	20A	4D
	Placa 3M Petrifilm/ Agar	Staph Express	Agar EAM 100µl	Agar EAM 100µl	Agar Manitol salado 100µl
	Descripción macroscópica de la colonia del Petrifilm o agar (forma, tamaño, borde y color)	Mediana, circular, azul, bordes lisos	Mediana, blanca redonda cremosa, con bordes ondulados	Grande , redonda, morado intenso cremosa, bordes lisos	Mediana, redonda, blanquecina cremosa, bordes lisos

MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA	Morfología celular		Cocos /racimos	Cocos /racimos	Cocos /cadenas	Cocos /racimos
	Tinción Gram		Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
PRUEBAS BIOQUÍMICAS	Catalasa		Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
	Oxidasa		Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
	OF		Fermentativo	Oxidativo	Fermentativo	Inerte
	Agar sangre	Crecimiento	Redonda, blanca transparente, 1mm	Blanca cremosa, redonda , >1mm	Transparente cremosa, redonda>1mm	Blanca cremosa, redonda, 1mm
		Hemólisis	β	γ	γ	β
	Agar manitol salado		Colonias pequeñas rojas	No fermento ni creció	Colonias pequeñas rojas	No fermento ni creció
	Coagulasa		Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
	Crecimiento en NaCl 6.5%		Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
	KLIGLER	Glucosa	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
		Lactosa	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
		Gas	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
H ₂ S		Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	
UREA		Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	

DISCOS DE ANTIBIOTICOS PARA IDENTIFICACION	Ácido Nalidíxico 30µg	Sensible	Sensible	Sensible	Resistente
	Bacitracina 0.04U	Resistente	Resistente	Resistente	Sensible
	Novobiocina 5 µg	Sensible	resistente	Resistente	Sensible
	Optoquina 5 µg	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente
I IDENTIFICACION DEL MICROORGANISMO	Género y especie	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Streptococcus viridans</i>	<i>Micrococcus luteus</i>

β=Beta hemólisis, γ=Alfa hemólisis, Resistente= sin formación de halo, Sensible =formación de halo de inhibición

Realizado por: BENAVIDES Cytia, 2017

Tabla 3-10: Pruebas Bioquímicas para la identificación de Cocos Gram Positivos de las aguas termales de Cunuyacu

PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN								
ORIGEN	Código de la cepa	M 3.2	M3.2	M3.1	M3.1	M3.2	EAM3.2	MAM3.2
	Número de muestra	5A	9A	10C	21C	15C	22B	23D
	Placa 3M Petrifilm/ Agar	Recuento rápido de aerobios	Recuento rápido de aerobios	Recuento de <i>E.coli</i> y Coliformes	Recuento de <i>E.coli</i> y Coliformes	Recuento de <i>E.coli</i> y Coliformes	Staph Express	Agar Manitol salado 100µl
	Descripción macroscópica de la colonia del Petrifilm o agar (forma, tamaño, borde y color)	Pequeña, ovalada, roja oscuro con filo negro, bordes lisos	Bien pequeña redonda, azul, bordes enteros	Grande morada, con el filo bien marcado, bordes lisos	Mediana, morada, con puntos azules, bordes ondulados.	Bien pequeña, puntiforme, morada con punto rojo, bordes enteros	Pequeña redonda azul con punto rojo en el centro, bordes enteros	Mediana , blanca cremosa, de bordes lisos
MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA	Morfología celular	Cocos /cadenas	Cocos /racimos	Cocos /cadenas	Cocos /cadenas	Cocos /cadenas	Cocos /racimos	Cocos /racimos
	Tinción Gram	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
	Catalasa	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo

PRUEBAS BIOQUIMICAS	Oxidasa	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	
	OF	Fermentativo	Fermentativo	Fermentativo	oxidativo	Inerte	Inerte	Inerte	
	Agar sangre	Crecimiento	Redonda transparente, cremosa <1mm	Blanca transparente, redonda , >1mm	Amarilla cremosa, redonda, 1mm	Blanca cremosa, redonda, >1mm	Blanca cremosa, redonda, < 1mm	Blanca redonda, >1mm	Amarillento cremosa, redonda, voluminosa
		Hemólisis	β	β	β	β	γ	β	γ
	Agar manitol salado	No fermento ni creció	No fermento ni creció	Colonias pequeñas y blancas	Colonias pequeñas y blancas	Colonias pequeñas y blancas	Colonias pequeñas y rojas	No fermento ni creció	
	Coagulasa	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	
	Crecimiento en NaCl 6.5%	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	
	KLIGLER	Glucosa	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
		Lactosa	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
		Gas	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
H ₂ S		Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	
	UREA		Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	

DISCOS DE ANTIBIOTICOS PARA IDENTIFICACION	Ácido Nalidíxico 30µg	Sensible	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente
	Bacitracina 0.04U	Resistente	Sensible	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Sensible
	Novobiocina 5 µg	Resistente	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Resistente	Sensible
	Optoquina 5 µg	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente
IDENTIFICACION DEL MICROORGANISMO	Género y especie	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<i>Micrococcus luteus</i>

β=Beta hemólisis, γ=Alfa hemólisis, Resistente= sin formación de halo, Sensible =formación de halo de inhibición

Realizado por: BENAVIDES Cyntia, 2017

En las tablas 3-8, 3-9 y 3-10 se muestran los resultados de cocos Gram positivos obtenidos de las aguas termales de Cunuyacu. Se aislaron 25 clones bacterianos de los cuales 18 corresponden a cocos Gram positivos en la prueba de la catalasa el 94% de los clones aislados dieron como resultado positivo, pudiendo pertenecer a la familia *Micrococcaceae* o al género *Staphylococcus*, mientras que el 6% dieron negativo, lo que indica que no tienen la enzima catalasa y que pudiera pertenecer a los géneros *Streptococcus spp.* (Hernández, 2010, p. 6)

En la prueba de la oxidasa el 22% de los clones arrojó resultado positivo y el 78% dieron resultado negativo, por lo que podemos decir que la mayoría de clones bacterianos aislados no tenían las enzimas oxidasas; para la prueba de la oxidación- fermentación el 50% de los aislados bacterianos oxidaron los

carbohidratos, 11% fermentaron los carbohidratos y el 39% fueron de naturaleza inerte ya que no metabolizaron el azúcar por ninguna de las dos vías, oxidativa ni fermentativa. (Tablas 3-8, 3-9 y 3-10)

Se realizó la siembra de los aislados bacterianos en agar sangre, en el que se pudo identificar características macroscópicas y el tipo de hemólisis que presenta cada clon, dando como resultado el 61% para hemólisis beta y el 39% hemólisis gama, no existió clones con alfa hemólisis.

Se realizó la siembra en agar manitol salado en el que el 61% no presenta ni crecimiento ni fermentación, el 22% presento el crecimiento de colonias pequeñas y blancas y el 17% presentaron colonias rojas rodeadas de una zona roja que se podría presumir pertenecen a *Staphylococcus epidermidis*. (Becton Dickinson, 2013)

Para las pruebas de coagulasa y crecimiento en caldo hipersalino al 6.5% dieron negativas para todos los clones aislados. Para las pruebas realizadas en Kligler se obtuvo que el 72% fermentó en glucosa y el 17% fermento glucosa y lactosa. Para la prueba de la urea el 39% de los clones bacterianos aislados dieron positivo porque pudieron desdoblar la urea mientras que el 61% arrojaron un resultado negativo.

Para finalizar se realizaron las pruebas de sensibilidad al ácido Nalidíxico, Bacitracina, Optoquina y Novobiocina para cada uno de los clones bacterianos, de esta forma se puede diferenciar de mejor forma la sensibilidad o resistencia que cada aislado bacteriano presenta a cada uno de estos antibióticos.

3.9. Pruebas Bioquímicas para la identificación de Bacilos Gram negativos de las aguas termales de Cunuyacu

Tabla 3-11: Pruebas Bioquímicas para la identificación de Bacilos Gram negativos de las aguas termales de Cunuyacu

PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN							
	Código de la cepa	M 3.1	M3.2	M3.2	M3.2	M3.1	M3.1
ORIGEN	Número de muestra	4A	16B	19B	21B	23B	43A
	Placa 3M Petrifilm/ Agar	Recuento rápido de aerobios	Recuento rápido de aerobios	Recuento rápido de aerobios	Recuento de Staph Express	Recuento de <i>E.coli</i> y Coliformes	Recuento rápido de aerobios
	Descripción macroscópica de la colonia del Petrifilm o agar (forma, tamaño, borde y color)	Mediana, ovalada azul bien oscuro con filo celeste, borde liso	Pequeña azul oscuro, redonda de bordes ondulados	Bien pequeña redonda, de color rojo intenso y bordes lisos	Mediana, redonda, azul , bordes ondulados.	Mediana ovalada azul intenso con bordes enteros	Mediana, blanca cremosa, redonda de bordes lisos
	MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA	Morfología celular	Bacilos	Bacilos	Bacilos	Bacilos	Bacilos
	Tinción Gram	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
	Catalasa	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
	Oxidasa	positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo

PRUEBAS BIOQUIMICAS	OF		Inerte	Fermentativo	Oxidativo	Oxidativo	Oxidativo	Inerte
	Agar sangre	Crecimiento	Redonda transparente, >1mm	Blanca cremosa, redonda, <1mm	Redonda, transparente <1mm	Redonda, transparente <1mm	redonda, blanca transparente < 1mm	Blanca grumosa, >1mm
		Hemólisis	γ	γ	β	β	γ	β
	Agar MacConkey		Crecimiento colonias pequeñas transparentes	Crecimiento colonias pequeñas	Colonias pequeñas abundantes incoloras	Colonias pequeñas incoloras	Sin crecimiento	Colonias pequeñas y rojisas
	Agar Salmonella-Shigella		Sin crecimiento	Sin crecimiento	Crecimiento colonias incoloras	Crecimiento colonias incoloras	Sin crecimiento	Crecimiento colonias incoloras
	Agar Eosina Azul de Metileno		Crecimiento colonias pequeñas	Crecimiento de colonias amarillas pequeñas	Abundante crecimiento incoloro	Crecimiento de colonias incoloras	Colonias pequeñas verde bilis brillante	Crecimiento de colonias incoloras abundantes
	KLIGLER	Glucosa	+	+	+	+	+	+
		Lactosa	+	+	-	-	+	-
Gas		-	+	-	-	+	-	
H ₂ S		-	-	-	-	-	-	

	UREA	+	-	+	+	-	+
	SIM	Movilidad	-	-	-	-	-
		Indol	-	+	-	-	-
		H ₂ S	-	-	-	-	-
	CITRATO	+	+	+	+	+	+
IDENTIFICACION DEL MICROORGANISMO	Género y especie	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Pseudomonas ssp</i>	<i>Pseudomonas ssp</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas ssp</i>

β=Beta hemólisis, γ=Alfa hemólisis, Resistente= sin formación de halo, Sensible =formación de halo de inhibición

Realizado por: BENAVIDES Cyntia, 2017

En la tabla 3-11 se muestran los resultados de la identificación de bacilos Gram negativos obtenidos en las aguas termales de Cunuyacu. De los 25 clones aislados 6 fueron identificados como bacilos Gram negativos, estos contenían la enzima catalasa que descompone el peróxido de hidrogeno en agua y oxigeno molecular dando, catalasa positiva para todos los aislados bacterianos. Para la prueba de la oxidasa el 67% dio resultado positivo pues estas contienen las enzimas oxidasas.

Para la prueba de la oxidación- fermentación obtuvimos que el 50% de los aislados bacterianos oxidaron los carbohidratos, el 17 % fermentaron los carbohidratos y el 33% fueron inertes pues no metabolizaron azúcar ni por vía fermentativa ni oxidativa.

La siembra realizada en agar sangre nos dio como resultados el crecimiento de colonias blancas cremosas, presentaron el 50% de beta hemolisis y el 50% de gama hemolisis. En el agar eosina azul de metileno hubo crecimiento de los clones bacterianos, para la muestra 23B hubo fermentación de lactosa dando colonias de color verde bilis brillante presumiendo la presencia de *Escherichia coli*

En el agar MacConkey hubo crecimiento bacteriano (tabla 3-11) para todas los aislados por lo que no fermentaron lactosa y originaron el crecimiento de colonias pequeñas y transparentes, además el medio cambio de tono a amarillo ámbar, presumiendo que se trataría de microorganismo del genero *Pseudomonas*. Excepto para la muestra 23B que no presento ningún tipo de crecimiento. (Becton Dickinson, 2013) (Laboratorios Britania S.A., 2015)

Para el medio Kligler el 100% de los clones bacterianos fermentaron glucosa, el 50% fermento glucosa y lactosa, ninguno de los aislados produjo gas ni ácido sulfhídrico. Para las pruebas realizadas en el medio citrato dieron el 100% positiva lo que nos indica que las bacterias aisladas utilizan citrato como única fuente de carbono y nitrógeno.

En la prueba de la urea el 67% de los aislados bacterianos dieron positivos, el 33% dio como resultado negativo lo que nos indica que estas bacterias no pueden desdoblar la urea, para el medio SIM se pudo ver que ningún aislado bacteriano tiene movilidad, pues no existió crecimiento por encima de la línea de inoculación, ningún aislado produjo ácido sulfhídrico.

Para la prueba del Indol el único clon que dio resultado positivo es el correspondiente a 16B (tabla 3-11), pues existió la formación de un anillo rojo tenue que indicaría la presencia de escatol que es un derivado del Indol. (Álvarez, 1995)

3.10 Pruebas bioquímicas para la identificación del Bacilo Gram positivo de las aguas termales de Cunuyacu

Tabla 3-12: Pruebas bioquímicas para la identificación del bacilo Gram positivo de las aguas termales de Cunuyacu

PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN			
ORIGEN	Código de la cepa		M 3.1
	Número de muestra		24A
	Placa 3M Petrifilm/ Agar		Eosina azul de metileno
	Descripción macroscópica de la colonia del Petrifilm o agar (forma, tamaño, borde y color)		Colonia blanca , cremosa redonda, grande, bordes lisos
MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA	Morfología celular		Bacilos
	Tinción Gram		Positivo
	Catalasa		Positivo
	Oxidasa		Negativo
	OF		Inerte
	Agar sangre	Crecimiento	Colonias blancas redondas cremosas, <1mm
		Hemólisis	γ
	Agar Gelatina		formación de una zona clara alrededor de la colonia

PRUEBAS BIOQUIMICAS	Agar Almidón		Negativo
	Agar Manitol		Sin crecimiento
	Agar Eosina Azul de Metileno		Crecimiento colonias pequeñas blancas
	KLIGLER	Glucosa	-
		Lactosa	-
		Gas	-
		H ₂ S	-
	UREA		+
	SIM	Movilidad	-
		Indol	-
		H ₂ S	-
CITRATO		-	
IDENTIFICACION DEL MICROORGANISMO	Género y especie		<i>Bacillus spp</i>

Realizado por: BENAVIDES Cyntia, 2017

En la tabla 3-12 se observan los resultados obtenidos para el bacilo Gram positivo de las aguas termales de Cunuyacu. Finalmente de los 25 clones uno fue un bacilo Gram positivo, para la prueba de la catalasa dio positivo, lo que indica que la bacteria poseía la enzima catalasa que es la que descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular, la prueba de la oxidasa fue negativa por lo que el microorganismo no poseía la enzima oxidasa.

En la prueba de oxidación fermentación esta bacteria dio como resultado inerte (tabla 3-12), por lo que no pudo metabolizar azúcar ni por vía oxidativa y fermentativa. Para agar sangre existió crecimiento de colonias blancas cremosas menores a 1mm de diámetro con hemólisis gamma.

Para el agar manitol salado hubo crecimiento de colonias pequeñas y no hubo fermentación (tabla 3-12), para el agar eosina azul de metileno también hubo presencia de crecimiento, mientras que para MacConkey no existió crecimiento. Esta bacteria presentó una zona clara alrededor de la colonia y un precipitado de color blanco que se da por la reacción de la gelatina con el cloruro mercurio ácido, además existió hidrólisis de almidón pues alrededor del inóculo se formó una zona clara alrededor, la enzima amilasa hidroliza el almidón.

Con respecto a Kligler este aislado bacteriano dio negativo para glucosa, urea dio positivo, citrato negativo, movilidad negativo y tampoco produjo Indol ni ácido sulfhídrico.

3.11 Identificación de los clones bacterianos aislados de las muestras tomadas de las aguas termales de Cunuyacu

Los clones bacterianos aislados fueron obtenidos a partir de las placas 3M Petrifilm y de los agares Eosina azul de metileno y manitol salado respectivamente, fueron identificados mediante sus características macroscópicas, microscópicas y de las pruebas bioquímicas, los resultados obtenidos se muestran en la tabla

Tabla 3-13: Identificación de las colonias aisladas a partir de las aguas termales de Cunuyacu

CÓDIGO	GÉNERO	ESPECIE	PORCENTAJE DE COINCIDENCIA DE LA IDENTIFICACIÓN	NUMERO DE MICROORGANISMOS IDENTIFICADOS	PORCENTAJE TOTAL DE MICROORGANISMOS PRESENTES EN LAS AGUAS TERMALES
21B	<i>Staphylococcus</i>	<i>epidermidis</i>	70%	8	32%
10C	<i>Staphylococcus</i>	<i>epidermidis</i>	70%		
21C	<i>Staphylococcus</i>	<i>epidermidis</i>	80%		
15C	<i>Staphylococcus</i>	<i>epidermidis</i>	80%		
3 A	<i>Staphylococcus</i>	<i>epidermidis</i>	60%		
12 A	<i>Staphylococcus</i>	<i>epidermidis</i>	70%		
9C	<i>Staphylococcus</i>	<i>epidermidis</i>	70%		
18C	<i>Staphylococcus</i>	<i>epidermidis</i>	70%		
14 A	<i>Micrococcus</i>	<i>luteus</i>	60%	3	12%
4D	<i>Micrococcus</i>	<i>luteus</i>	70%		
23 D	<i>Micrococcus</i>	<i>luteus</i>	80%		
20 A	<i>Streptococcus</i>	<i>viridans</i>	80%	2	8%
4C	<i>Streptococcus</i>	<i>viridans</i>	70%		
5 A	<i>Streptococcus</i>	<i>agalactiae</i>	60%	1	4%
9A	<i>Streptococcus</i>	<i>pyogenes</i>	80%	1	4%

22B	<i>Staphylococcus</i>	<i>saprofiticus</i>	70%	3	12%
1 A	<i>Staphylococcus</i>	<i>saprofiticus</i>	70%		
7 A	<i>Staphylococcus</i>	<i>saprofiticus</i>	80%		
4 A	<i>Citrobacter</i>	<i>amalonaticus</i>	60%	1	4%
16B	<i>Enterobacter</i>	<i>cloacae</i>	90%	1	4%
19B	<i>Pseudomonas</i>	<i>spp</i>	70%	3	12%
21B	<i>Pseudomonas</i>	<i>spp</i>	80%		
43 A	<i>Pseudomonas</i>	<i>spp</i>	90%		
23 B	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	90%	1	4%
24 A	<i>Bacillus</i>	<i>spp</i>	80%	1	4%

Realizado por: BENAVIDES Cyntia, 2017

En la tabla 3-13 se muestran las bacterias identificadas con sus respectivos porcentajes obtenidos de las aguas termales de Cunuyacu. De los 25 clones seleccionados e identificados obtuvimos que las cepas *Staphylococcus epidermidis* tienen un porcentaje de coincidencia de entre el 60 y 80% (tabla 13-3), los *Micrococcus luteus* fueron identificados con un porcentaje de entre el 60 y 80% (tabla 13-3), los *Streptococcus viridans* en la gran mayoría con un 70 y 80%,

Para el *Streptococcus agalactiae* con un 60% de coincidencia (tabla 13-3), *Streptococcus pyogenes* con un porcentaje de coincidencia del 80% (tabla 3-13), *Citrobacter amalonaticus* el porcentaje de coincidencia fue del 60%, otra bacteria identificada fue *Enterobacter cloacae* que tuvo el 90% de coincidencia, las *Pseudomonas spp* obtuvieron un porcentaje de coincidencia de entre el 70 y 90% , *Escherichia coli* obtuvo un porcentaje de coincidencia del 90% y por último el clon de *Bacillus spp* obtuvo un porcentaje de coincidencia del 80%.

Los resultados obtenidos (tabla 13-3), podemos decir que en las aguas termales de Cunuyacu existe un predominio de *Staphylococcus epidermidis* pues presenta el 32% del total de clones aislados e identificados, seguido por *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus saprofiticus* y *Pseudomonas spp* presentan el 12% del total de clones identificados.

Streptococcus viridans presentó un 8% y *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Citrobacter amalonaticus*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* y *Bacillus spp* presentan un 4% cada uno respectivamente como se indica en el gráfico 7-3.

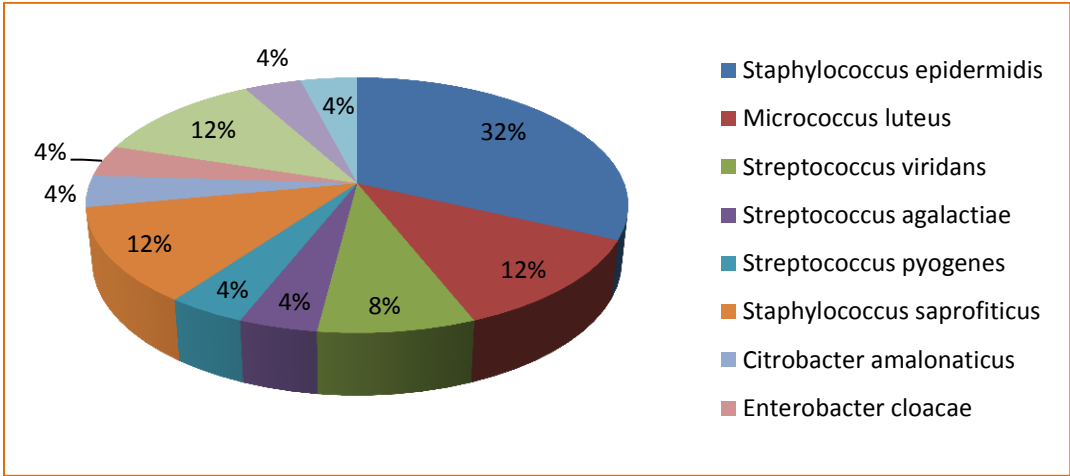


Gráfico 7-3: Porcentaje total de clones bacterianos identificados por género y especie

Realizado por: BENAVIDES Cyntia, 2017

3.12 Evaluación de la resistencia antimicrobiana de los cocos Gram positivos aislados e identificados de las aguas termales de Cunuyacu

Tabla 3-14: Antibiograma de los cocos Gram Positivos aislados e identificados de las aguas termales de Cunuyacu

Código	BACTERIA IDENTIFICADA	ANTIBIÓTICOS													
		AM 10µg	AMC 30 µg	CIP 5 µg	CN 300 µg	CRO 300 µg	E 15 µg	F 300 µg	IPM 10µg	K 30 µg	KF 30 µg	OX 1 µg	P 10U	TE 30 µg	VA 30 µg
1 A	<i>Staphylococcus saprofiticus</i>	R	R	S	S	S	R	I	S	I	R	R	R	R	R
3 A	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	R	R	MS	MS	S	R	S	S	R	R	S	R	S	R
7 A	<i>Staphylococcus saprofiticus</i>	R	S	S	R	S	R	S	S	MS	R	R	R	R	R
12 A	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R	R	R	R
4 C	<i>Streptococcus viridans</i>	R	R	R	S	R	S	S	S	S	R	R	S	S	R
9 C	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	R	S	I	MS	MS	R	S	S	R	S	R	R	R	S
18 C	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	MS	R	S	S	MS	R	I	S	R	S	R	R	R	S

21 B	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	R	R	R	S	MS	R	S	S	R	R	R	I	R	S
14 A	<i>Micrococcus luteus</i>	R	R	I	R	R	MS	S	S	R	S	I	R	R	R
20 A	<i>Streptococcus viridans</i>	R	R	R	S	R	S	MS	S	I	MS	R	R	R	S
4 D	<i>Micrococcus luteus</i>	R	R	I	R	I	S	S	S	R	I	R	R	R	MS
5A	<i>Streptococcus agalactiae</i>	R	R	S	R	S	MS	S	S	R	R	R	R	R	R
9 A	<i>Streptococcus pyogenes</i>	R	R	S	S	S	R	S	S	MS	R	R	R	R	R
10 C	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	R	R	I	S	R	R	S	S	R	R	R	R	MS	R
21 C	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	R	R	S	S	R	R	S	S	R	R	I	S	R	R
15 C	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	S	S	R	R	R	R	S	S	R	S	S	R	S	R
22 B	<i>Staphylococcus saprofiticus</i>	S	S	S	S	R	MS	S	S	R	S	S	R	S	MS
23 D	<i>Micrococcus luteus</i>	R	R	I	S	S	I	S	S	R	S	R	R	R	S

AM=ampicilina, KF= cefalotina, E=eritromicina, F=nitrofurantoina, CN=gentamicina, CRO=ceftriaxona, AMC=amoxicilina + ácido clavulánico, IPM= imipenem, K=kanamicina, P=penicilina, TE=tetraciclina, Va=vancomicina, OX=oxacilina, CIP=ciprofloxacina, R=Resistente, S=Sensible, I=Intermedio, MS=Moderadamente sensible.

Realizado por: BENAVIDES Cyntia, 2017

En la tabla 3-14 se muestra los resultados de los antibiogramas obtenidos de los cocos Gram positivos de las muestras de las aguas termales de Cunuyacu. Se observa que el antibiótico de mayor efectividad es el Imipenem ya que mostro actividad bactericida contra todos los aislados bacterianos estudiados, seguido por la nitrofurantoína que no mostro resistencia ante ninguno de los aislados, solo dos muestras (1A y 18C) presentaron un resultado intermedio y una (20C) fue medianamente sensible.

Otro de los aislados bacterianos (22B) presentó mayor sensibilidad, pues tuvo poder bactericida en 8 de los antibióticos, y mostro resistencia a ceftriaxona, kanamicina y penicilina.

Los resultados que se muestran en la tabla 3-14 indican además que los clones aislados de las aguas termales de Cunuyacu presentan multiresistencia a los antibióticos teniendo en cuenta que 6 de las 18 bacterias que representan el 33% muestran resistencia a 8 antibióticos, 3 clones bacterianos que corresponde al 17% presentan resistencia a 9 antibióticos, 5 de los aislados bacterianos que corresponde al 28% indican resistencia a 7 antibióticos y 3 de los clones(17%) presentan resistencia a 6 antibióticos.

De los 18 aislados bacterianos 8 fueron identificados como *Staphylococcus epidermidis*, presentando el 100% de resistencia para todos los clones identificados como esta especie, el 87,5% presentó resistencia a la kanamicina, la amoxicilina indico un 75% de resistencia, para los antibióticos ciprofloxacina, amoxicilina más ácido clavulánico, oxaciclina, penicilina, tetraciclina y vancomicina hubo un 62,5% de resistencia y finalmente tenemos a la ceftriaxona con un 12,5% de resistencia (Tabla 3-14).

En todos los casos los aislados bacterianos presentan multiresistencia, pues no presentan actividad bactericida en la mayoría de los antibióticos utilizados en el antibiograma

Los 3 clones identificados como *Micrococcus luteus* presentan resistencia a la ampicilina, amoxicilina más ácido clavulánico, nitrofurantoína, tetraciclina y kanamicina en un 100%, la ciprofloxacina presenta el 100% de sensibilidad intermedia, la gentamicin y la oxaciclina preentan resistencia del 66.6%, mientras que la cefalotina presenta el 66.6% de sensibilidad y

para los antibióticos eritromicina, vancomicina y ceftriaxona tenemos en proporciones iguales sensibilidad y resistencia.

Los dos clones de *Streptococcus viridans* presentan 100% de resistencia para los antibióticos ampicilina, amoxicilina más ácido clavulánico, ciprofloxacina, ceftriaxona y oxacilina, en comparación con la eritromicina y la gentamicina que presentan el 100% de sensibilidad, la penicilina, tetraciclina y vancomicina presentan el 50% de sensibilidad y resistencia respectivamente y finalmente la nitrofurantoína y la kanamicina presentan el 50% de sensibilidad y el 50% de sensibilidad moderada e intermedia.

3 de los clones fueron identificados como *Staphylococcus saprofiticus* y de los cuales el 100% de los clones presenta sensibilidad a la ciprofloxacina, para la ampicilina, eritromicina, cefalotina, oxacilina, penicilina, tetraciclina y vancomicina se presenta el 66,6% de resistencia, la amoxicilina más ácido clavulánico, en tanto que la gentamicina y ceftriaxona presentan el 66,6% de sensibilidad a este antibiótico y finalmente la kanamicina presenta el 33,3% de resistencia, sensibilidad intermedia y sensibilidad moderada respectivamente.

Para el *Streptococcus agalactiae* muestra que para los antibióticos ampicilina, amoxicilina más ácido clavulánico, gentamicina, oxacilina, tetraciclina y penicilina presentan resistencia y para ciprofloxacina, cefalotina y la ceftriaxona presentan sensibilidad intermedia y finalmente para la vancomicina se presenta una sensibilidad moderada.

La resistencia a los antibióticos es en la actualidad uno de los problemas más graves en el mundo, la resistencia se puede producir por muchos mecanismos como es la destrucción o inactivación del antibiótico a través de la producción de enzimas que lo hidrolizan, la presencia de una capa de lípidos externa en la membrana que imposibilita el ingreso del antibiótico al interior de la célula. (Oromi J, 200, pp 8-9)

3.13 Evaluación de la resistencia antimicrobiana de los Bacilos Gram negativos aislados e identificados de las aguas termales de Cunuyacu

Tabla 3-15: Antibiograma de los Bacilos Gram negativos aislados e identificados de las aguas termales de Cunuyacu

Código	BACTERIA IDENTIFICADA	ANTIBIOTICOS												
		AM 10µg	AMC 30 µg	CIP 5 µg	CN 300 µg	CRO 300 µg	SXT 25U µg	F 300 µg	IPM 10µg	K 30 µg	KF 30 µg	S 300 µg	PY 100 µg	TE 30 µg
4 A	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S
16 B	<i>Enterobacter cloacae</i>	R	R	S	R	MS	S	R	I	I	R	S	R	I
19 B	<i>Pseudomonas spp</i>	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
21 B	<i>Pseudomonas spp</i>	S	S	S	R	R	S	S	S	R	R	S	R	MS
23 B	<i>Escherichia coli</i>	R	R	S	S	MS	S	I	R	R	R	S	p	R
43 A	<i>Pseudomonas spp</i>	R	S	S	S	MS	R	S	S	S	S	S	R	I

AM=ampicilina, PY=carbenicilina, KF=cefalotina, S=estreptomicina, F=nitrofurantoina, CN=gentamicina, CRO=ceftriaxona, AMC=amoxicilina + ácido clavulánico, IPM= imipenem, K=kanamicina, SXT=trimetoprim-sulfametoxazol, TE=tetraciclina, CIP=ciprofloxacina, R=Resistente, S=Sensible, I=Intermedio, MS=Moderadamente sensible.

Realizado por: BENAVIDES Cyntia, 2017

En la tabla 3-15 podemos ver los resultados obtenidos de los bacilos Gram negativos aislados de las aguas termales de Cunuyacu en lo que muestran que los 6 clones aislados son sensibles a la ciprofloxacina y a la estreptomycin, la mayoría presenta multiresistencia bacteriana como es el caso de la carbenicilina que muestra resistencia en el 100% sus clones aislados e identificados.

Los 6 clones aislados presentan multiresistencia para los antibióticos utilizados en el antibiograma, en la tabla 3-15 se puede observar que los aislados identificados como *Pseudomona spp* tienen resistencia a 2-3 antibióticos y mayor sensibilidad en los 10 antibióticos restantes, en el caso de *Citrobacter* muestra resistencia a 10 antibióticos mostrando sensibilidad solo a la ciprofloxacina, estreptomycin y tetraciclina.

Enterobacter cloacae presenta resistencia a 6 antibióticos, sensibilidad moderada a la ceftriaxona y sensibilidad intermedia a al Imipenem, kanamicina y tetraciclina. Estos resultados obtenidos igual indican multiresistencia a la mayoría de antibióticos usados, haciendo que estos no puedan ejercer su actividad inhibidora de crecimiento.

En un estudio realizado por Rosenberg en 1989, muestra que en las aguas minerales de 87 muestras que investigaron, tienen la presencia de bacterias heterótrofas principalmente del género *Pseudomona* que es resistente a los antibióticos, 81 de las cepas presentaron o determinaron la presencia de *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens*, etc.

Estas especies fueron resistentes a antibióticos como el cloranfenicol, ampicilina, gentamicina y tetraciclina. Messi en el año 2005 aislo 120 cepas de aguas minerakles, y las especies que predominaron fueron *Pseudomona aeuroginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas stutzeri* y con baja frecuencia de *Burkholderia cepacia*, estas bacterias presentaron resistencia a antibióticos como ampicilina, gentamicina. amikacina y ácido Nalidíxico. .

Un estudio realizado sobre resistencia microbiana por Andueza y colaboradores en el 2015 en cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, aisladas a partir de las aguas termales de la provincia de Chimborazo, mostraron que las 15 cepas aisladas fueron sensibles a la vancomicina y resistentes

a la ampicilina y ampicilina más sulbactán. El 33,3% de las cepas mostraron multirresistencia a los antibióticos ampicilina, amikacina, ceftazidime, ciprofloxacina y cefepime.

Uno de los clones aislados es *Citrobacter amalonaticus* que según un estudio realizado por Navarro y colaboradores en el año 2010 indican la resistencia de esta bacteria a la ampicilina y a la ticarcilina, al hacer la comparación con los resultados obtenidos de las aguas termales de Cunuyacu nuestra cepa también presenta resistencia a ese antibiótico, mostrando claramente la que no hay actividad bactericida, esta resistencia puede ser adquirida (cambios genéticos) o intrínseca. (Navarro, et al, 2010)

3.13. Evaluación de la resistencia antimicrobiana del Bacilo Gram positivo aislado e identificado de las aguas termales de Cunuyacu

Tabla 3-16: Antibiograma de los Bacilos Gram Positivos aislados e identificados de las aguas termales de Cunuyacu

Código	BACTERIA IDENTIFICADA	ANTIBIOTICOS													
		AM 10µg	AMC 30 µg	CIP 5 µg	CN 300 µg	CRO 300 µg	E 15 µg	F 300 µg	IPM 10µg	K 30 µg	KF 30 µg	OX 1 µg	P 10U	TE 30 µg	VA 30 µg
24 A	Bacillus spp	R	R	S	S	R	S	R	S	S	R	R	R	R	R

AM=ampicilina, KF= cefalotina, E=eritromicina, F=nitrofurantoina, CN=gentamicina, CRO=ceftriaxona, AMC=amoxicilina + ácido clavulánico, IPM= imipenem, K=kanamicina, P=penicilina, TE=tetraciclina, Va=vancomicina, OX=oxacilina, CIP=ciprofloxacina, R=Resistente, S=Sensible, I=Intermedio, MS=Moderadamente sensible.

Realizado por: BENAVIDES Cyntia, 2017

La tabla 3-16 muestra los resultados obtenidos del antibiograma de las aguas termales de Cunuyacu en los que muestra resistencia para la ampicilina, amoxicilina más ácido clavulánico, ceftriazona, nitrofurantoína, cefalotina, oxaciclina, penicilina , tetraciclina y vancomicina haciendo de esta una bacteria multiresistente, pues la sensibilidad que presenta es solo para ciprofloxacina, gentamicina, eritromicina, imipemen y kanamicina.

Un estudio realizado por Faría y colaboradores en el 2011 sobre resistencia a los antimicrobianos para especies de *Bacillus* aislados en leche cruda reportó que algunas cepas de 69 *Bacillus* eran resistentes a los aminoglucosidos, fluoroquinolonas y eritromicina. Al comparar con nuestros resultados existe similitud en la resistencia ya que presentan resistencia a la penicilina, oxaciclina y nitrofurantoína, tiene un patrón inhibitorio solo para ciprofloxacina, gentamicina, eritromicina imipenem y kanamicina.

La resistencia a los antibióticos es un problema reportado a nivel mundial y las causas principales han sido el uso inapropiado de los antibióticos, que puede ser bajo prescripción médica para tratar infecciones, uso frecuente de antibióticos de amplio espectro o inadecuado uso que el paciente hace al momento de su tratamiento que puede ser en cuanto a dosis, hora de administración y duración del mismo, por lo que el microorganismo sobrevive y adquiere resistencia. (Oromi J, 200, pp 8-9

CONCLUSIONES

La evaluación de las aguas termales de Cunuyacu mostraron un promedio de 2475°C, con una temperatura ambiente de 18°C, teniendo que la temperatura que tienen estas aguas es superior a 7°C de la temperatura ambiente, lo que les da la condición de termal, con respecto al valor de pH obtenido de 6,25 nos indica que el agua termal es neutra.

En todos los puntos evaluados se encontraron bacterias aerobias mesófilas, las mismas que pueden ser de origen alóctono por ejemplo de las personas que frecuentan este lugar. Los promedios de las dos siembras no superan los 100UFC/mL, lo que nos indica que estas bacterias no presentan un riesgo sanitario.

Las especies bacterianas Gram positivas identificadas fueron *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus viridans* *Micrococcus luteus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes* correspondientes a cocos y solo una especie del género *Bacillus* spp. Las especies bacterianas Gram negativas identificadas fueron *Citrobacter amalonaticus*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas* spp, y *Escherichia coli* que corresponden al grupo de bacilos.

La evaluación de la actividad de los antibióticos sobre los aislados bacterianos identificados muestra una amplia variedad entre los clones, encontrando que existen clones con a un alto número a antibióticos resistentes (10) como es el caso de *Citrobacter amalonaticus*, en el caso de *Bacillus* spp, *Staphylococcus epidermidis* y *Streptococcus agalactiae* mostraron resistencia a 9 antibióticos dándoles la condición de multiresistentes, mientras que *Pseudomonas* spp, presentaron sensibilidad en 10 antibióticos.

RECOMENDACIONES

1. Mayor gestión por parte de las autoridades provinciales, cantonales y de la junta parroquial para mejorar las condiciones viales y de turismo que permitan la recreación y explotación turística de este lugar.
2. Investigar las aplicaciones biotecnológicas de los aislados bacteriano, ya que pueden llegar a ser útiles para el sector industrial o farmacéutico y ayudar a mejorar la economía de la Parroquia Pastocalle
3. Promocionar las aguas termales de Cunuyacu para fomentar el turismo y contribuir en el desarrollo de la parroquia y la provincia

BIBLIOGRAFIA

3M ESPAÑA S.A. *Petrifilm Sistema de Recuento Staph Express* [en línea]. Madrid: 2002. [Consulta: 10 enero2017]. Disponible en:

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjyoMy3xJTOAhXBFx4KHe3QBh4QFggI MAE&url=http%3A%2F%2Fmlmedia.3m.com%2Fmws%2Fmedia%2F374966O%2Fstxinterpguidespa.pdf&usg=AFQjCNHBIJho9-E2_aaNW-HfI6dFKDFoBw&sig2=qJLsWwcLCXZnXrjTN4fGMg

3M MÉXICO. *3M Placas Petrifilm para el Recuento de Aerobios* [en línea]. 2004. [Consulta: 10 enero 2017]. Disponible en:

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=4&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjWrOeZw5TOAhXDbR4KHRPIBDAQFggvMAM&url=http%3A%2F%2Fdepa.fquim.unam.mx%2Famyd%2Farchivero%2FPetrifilmAerobiccount_19100.pdf&usg=AFQjCNG3Ujrf0dt-Pwrereh5xaHXHQGBFA&sig2=e1c5rUdEv_B6cupzSvkRww

3M. *Placa Petrifilm para Recuento E. coli y Coliformes* [en línea]. Lima-Perú: 2006. [Consulta: 10 enero2017].Disponible en:

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwiXq__1w5TOAhVLox4KHT3WDKAQFggqMAE&url=https%3A%2F%2Fsystem.netsuite.com%2Fcore%2Fmedia%2Fmedia.nl%3Fid%3D4019%26c%3D3339985%26h%3D213791686acc9e9f7d61%26_xt%3D.pdf&usg=AFQjCNFu366dOuQaEwy2IV-tY_FXCmU3mw&sig2=3ejuBIrRc4ErnSjH8V2LcA

ACOSTA, et al.; *Aguas termales* [en línea] Caracterización geoquímica de las manifestaciones termales intermareales de Bahía Concepción en la Península de Baja California 2016. [Consultado: 26 de Diciembre del 2016]. Disponible en: https://es.wikipedia.org/wiki/Aguas_termales

Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA). *Resistencia a los antibióticos* [en línea]. 2007. [Consulta: 10 noviembre 2016]. Disponible en: https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0ahUKEwji_3x5e_NAhWL1x4KHSROCRAQFggeMAA&url=http%3A%2F%2Fwww.fda.gov%2Fdownloads%2FForConsumers%2FByAudience%2FForWomen%2Fucm121906.pdf&usq=AFQjCNH9p55CrU465Kp0sDxEC3fR5wAw&sig2=rXwPcrBHZLCeLVUGPf43KA&cad=a

ALVAREZ, M.; et al. Boquet. *Manual de Técnicas en Microbiología Clínica*. España: 1995, pp.1-305.

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. 28-30.

ANALIZA CALIDAD.; *Recuento de Microorganismos* [en línea] 2010 Análisis de microorganismos *Aerobios mesófilos* [Consultado: 06 de Enero del 2017]. Disponible en: [http://www.analizacalidad.com/docftp/fi189arm2004-4\(2\).pdf](http://www.analizacalidad.com/docftp/fi189arm2004-4(2).pdf)

ANDUEZA F; et al. Albuja. "Resistencia antimicrobiana en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de aguas termales de la provincia de Chimborazo, Ecuador". *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 81, 2, (2015), (Ecuador), pp. 158-163. ISSN 1697-4298.

APAZA R & GARCIA, M.; *Resistencia natural y adquirida*. [en línea] 2011 p.5. [Consulta: 16 de Diciembre del 2016]. Disponible en: [http://almageriatria.org/pdf_files/col_09/alumnos_3/Marco%20A.%20Garcia-%20Colombia-%20RESISTENCIA_MICROBIANA-2%20\(2\).pdf](http://almageriatria.org/pdf_files/col_09/alumnos_3/Marco%20A.%20Garcia-%20Colombia-%20RESISTENCIA_MICROBIANA-2%20(2).pdf)

BALNEARIOS.COM.; *Introducción al termalismo*. [en línea] 2006 p. 11. [Consulta: 03 de Diciembre del 2016]. Disponible en: http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/rehabilitacion-bal/introduccion_al_termalismo.pdf

BECTON DICKINSON GMBH. *BD EMB Agar (Eosin Methylene Blue Agar), Modified* [en línea]. 2013. [Consulta: 06 agosto 2016]. Disponible en: https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=10&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEWjY8Ji_uZTOAhWBVh4KHf_dC4sQFghGMAk&url=https%3A%2F%2Fwww.bd.com%2Fresource.aspx%253FIDX%253D8765&usg=AFQjCNHk6aLOCMWYvdmxtDBDODhOHSo6Wg&sig2=npkd3brZuF3bD-tnMY-mLg

BECTON DICKINSON GMBH. *BD Mannitol Salt Agar* [en línea]. 2013. [Consulta: 06 agosto 2016]. Disponible en: https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=5&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEWjL0Iu7_pPOAhVHlh4KHSlaAc8QFggyMAQ&url=https%3A%2F%2Fwww.bd.com%2Fresource.aspx%3FIDX%3D8771&usg=AFQjCNFf9dOgRHAeqv1a5weUKWiQ9_5_ww&sig2=bMaLWrb5u30gko0Uc5c4tA

BECTON DICKINSON GMBH. *BD Salmonella Shigella Agar* [en línea]. 2013. [Consulta: 10 enero 2017]. Disponible en: https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=3&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEWiywa69kpTOAhWKsh4KHV_QCq0QFggmMAI&url=http%3A%2F%2Fwww.bd.com%2Fresource.aspx%3Fidx%3D8779&usg=AFQjCNHBc78bX06ui9MBaINlr3NwOg&sig2=Xyhu0aTx2f5_0waZajWghhttp://britannialab.com.ar/esp/productos/b02/salmoshigagar.htm

BERNAL M. & GUZMAN M.; *El antibiograma de discos. Normalización de la técnica de Kirby-Bauer* [en línea] Unidad de Bacteriología Clínica. Grupo de Microbiología e Inmunología. Actualmente en el Grupo de Micobacterias. Instituto Nacional de Salud - Bogotá. 1984, pp. 1-10 [Consulta: 12 de Enero del 2017]. Disponible en: <https://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/viewFile/1891/1917>

BOQUET, Ernesto., et. al., Identificación microbiana. *Manual de Técnicas en Microbiología Clínica*. España. Garsi: 1995. pp. 44-148.

BRITANIALAB.; *Agar Salmonella Shigella*. [en línea]. 2010. [Consultado: 07 de Enero del 2017]. Disponible en: <http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/maconkeyagar.htm>

BRITANIALAB.; *Bacitracina* [en línea]. 2010. [Consultado: 15 de Enero del 2017]. Disponible en: <http://www.britanialab.com.ar/espanol/BACITRACINA.htm>

BRITANIALAB.; *Eosina Azul de Metileno* [en línea]. 2010. [Consultado: 12 de Enero del 2017]. Disponible en: <http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/embagar.htm>

BRITANIALAB.; *Kligler hierro agar*. [en línea]. 2010. [Consultado: 07 de Enero del 2017]. Disponible en: <http://britanialab.com.ar/esp/productos/b02/kliglerhierroagar.htm>

BRITANIALAB.; *Manitol Salado* [en línea]. 2010. [Consultado: 12 de Enero del 2017]. Disponible en: <http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/manitolsalagar.htm>

BRITANIALAB.; *SIM medio*. [en línea]. 2010. [Consultado: 07 de Enero del 2017]. Disponible en: <http://britanialab.com.ar/esp/productos/b02/simedio.htm>

BRITANIALAB.; *Simmons citrato Agar* [en línea]. 2010. [Consultado: 07 de Enero del 2017]. Disponible en: <http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/simmonscitagar.htm>

BRITANIALAB.; *Ureasa medio para la prueba*. [en línea]. 2010. [Consultado: 07 de Enero del 2017]. Disponible en: <http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/ureasamedprue.htm>

BURBANO, N et al. *Agua termomineral del Ecuador: INAMHI*. [en línea] Quito-Ecuador. 2013. pp. 6-13. [Consultado: 12 de Noviembre del 2016]. Disponible en: <http://issuu.com/inamhi/docs/termalismo>

BURBANO, Napoleón; et al. Becerra. *Aguas termo minerales en el Ecuador* [en línea] Ecuador:2013.[Consulta: 10noviembre2016]Disponibleen:<https://issuu.com/inamhi/docs/termalismo>

BURBANO, Napoleón; et al. Becerra. *Introducción a la Hidrogeología del Ecuador.* 2ª ed. Ecuador: 2015, pp.1-121

BUSTOS, Jaime; et al. Hamdan. "Staphylococcus aureus: la reemergencia de un patógeno en la comunidad". *Revista Biomed*, 17, 4 (2006), (México) pp. 287-305

CALDARIA. *Historia del termalismo: El origen de termas y balnearios* [en línea]. 2016. [Consulta: 10 noviembre 2016]. Disponible en: <http://www.caldaria.es/historia-del-termalismo-el-origen-de-termas-y-balnearios/>

CANO, Sara.; *Métodos de análisis microbiológico. Normas ISO, UNE.* [en línea] ANALIZA CALIDAD – Departamento de Formación 2006 p. 15 [Consulta: 03 de Diciembre del 2016]. Disponible en <http://www.analizacalidad.com/docftp/fi148anmic.pdf>

CARBAJAL, Ángeles.; GONZAES, María.; *Propiedades y funciones biológicas del agua* [en línea] Departamento de Nutrición, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, 2012 pp [Consulta: 03 de Diciembre del 2016]. Disponible en: <https://www.ucm.es/data/cont/docs/458-2013-07-24-Carbajal-Gonzalez-2012-ISBN-978-84-00-09572-7.pdf>

CERQUETTI, Cristina. *Bacilos Gram negativos: Enterobacterias* [en línea]. 2010. [Consulta: 10 enero 2017]. Disponible en: <http://www.fmed.uba.ar/depto/microbiologia/teo210.pdf>

CLAVELL, Luis; et al. Pedrique. *Selección de Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Microorganismos*. Venezuela: 2009. [Consulta: 10 enero 2017]. Disponible en: <http://www.ucv.ve/organizacion/facultades/facultaddefarmacia/programasacademicos/pregatedras/catedrademicrobiologia/materialdeapoyo/selecciondepruebasbioquimicas.html>

COMPENDIO DE MICROBIOLOGIA MÉDICA. *Bacillus, fisiología y características* [en línea]. 2014. [Consulta: 10 enero 2017]. Disponible en: <https://carlaurrutia87.wordpress.com/2014/03/24/bacillus-anthraxis/>

CONCHA, L.; *La química del agua* [en línea] 2008 [Consulta: 03 de Diciembre del 2016]. Disponible en: http://ww2.educarchile.cl/UserFiles/P0001/File/la_quimica_del_agua.pdf

CUAUTITLAN, *Bacterias géneros y especies* [en línea]. 2015. [Consulta: 10 enero 2017]. Disponible en: <http://microbitosblog.com/2015/04/28/pseudomonas-aeruginosa-p-putida-p-fluorescensmorfología-medios-de-cultivo-enfermedades-y-mas/>

CYTED.; *Indicadores de contaminación fecal en el agua* [en línea] Red Iberoamericana de Potabilización y Depuración del Agua 2003 p.2-3. [Consulta: 06 de Enero del 2017]. Disponible en: http://tierra.rediris.es/hidrored/ebooks/ripda/pdfs/Capitulo_20.pdf

DE LA ROSA JORGE, M^a del Carmen; & MOSSO ROMEO, M^a Ángeles. "Diversidad microbiana de las aguas minerales termales" *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, (2000), (Madrid-España), pp.153-158.

DE LA ROSA JORGE, M^a del Carmen; & MOSSO ROMEO, M^a Ángeles. "Diversidad microbiana de las aguas minerales termales" *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, (2000), (Madrid-España), pp.153-158.

DE LA ROSA, Ma del Carmen & MOSSO Ma de los Ángeles.; *Diversidad microbiana de las aguas minerales termales* [en línea] Dpto. Microbiología II. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. Madrid. 2000 pp.153-155 [Consulta: 06 de Enero del 2017]. Disponible en: <http://aguas.igme.es/igme/publica/pdfart3/diversidad.pdf>

DIAZ, G. *Morfología y estructura bacteriana.* [en línea] Fundamentos y técnicas de análisis microbiológicos 2009, p. 6-8. [Consulta: 11 de Diciembre del 2016]. Disponible en: <https://microbitos.files.wordpress.com/2010/06/morfologia-y-estructura-bacteriana.pdf>

ECURED.; *El agua y sus propiedades* [en línea] Química del agua 2017 [Consulta: 03 de Diciembre del 2016]. Disponible en: <https://www.ecured.cu/Agua>

ECURED.; *Medios de Cultivo* [en línea] Microbiología 2017 [Consulta: 11 de Diciembre del 2016]. Disponible en: [https://www.ecured.cu/Medio_de_cultivo_\(Microbiolog%C3%ADa\)](https://www.ecured.cu/Medio_de_cultivo_(Microbiolog%C3%ADa))

ERRECALDE, J.; *Los mecanismos de transferencia de resistencias.* [en línea] Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, Argentina, 2004 PP. 24-25. [Consulta: 11 de Diciembre del 2016]. Disponible en: <http://ftp.fao.org/docrep/fao/007/y5468s/y5468s00.pdf>

ESCUADERO, Eliana. *Factores que afectan a los microorganismos* [en línea]. 2012. [Consulta: 12 enero 2017]. Disponible en:

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=6&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjzjI_ghoHPAhXLHB4KHav3BIUQFggMAU&url=http%3A%2F%2Fbiblioteca.duoc.cl%2Fbdigital%2FDocumentos_Digitales%2F600%2F610%2F39592.pdf&usg=AFQjCNEplhmMDR1PsU14ebehLWgvJyQxEa&sig2=a5dJ1MrDOQz5M8GPZynJYg

FAGUNDO J et al. ; *Revisión bibliográfica sobre clasificación de las aguas minerales y mineromedicinales* [en línea] Centro Nacional de Termalismo “Víctor Santana” 2004 p 2.

[Consulta: 03 de Diciembre del 2016]. Disponible en:
http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/rehabilitacionbal/clasificacion_aguas_minerales.pdf

Food and Drug Administration: (FDA,) Office of Women's Health; *Resistencia a los antibióticos*. [en línea] Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA), Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) 2007, p. 2. [Consulta: 03 de Diciembre del 2016]. Disponible en:

<http://www.fda.gov/downloads/ForConsumers/ByAudience/ForWomen/ucm121906.pdf>

FÉLEZ, Marta.; *El agua* [en línea] 2009 [Consulta: 03 de Diciembre del 2016]. Disponible en:https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099.1/6263/03_Mem%C3%B2ria.pdf?sequence=4&isAllowed=y

FERNÁNDEZ, ANA, et al.; *Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología*. [en línea] Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 2006, pp 8-9. [Consulta: 03 de Diciembre del 2016]. Disponible en:

<https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf>

FLORES, B. *Técnicas de Identificación para la microscopía óptica*. Diagnóstico Microbiológico Buenos Aires-Argentina. Médica Panamericana. 2009. p. 48.

FLORES, Sandra. *Aislamiento, identificación y detección de microorganismos, con actividades biológicas, procedentes de las aguas de los manantiales termales la Mitisús y Santa Apolonia del estado Mérida.*, (Tesis postgrado). Maestría en Química de medicamentos, Universidad de Los Andes. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Mérida-Venezuela., 2013., pp. 70-90.

FUNDACION USAL.ES.; *Prueba de la coagulasa*. [en línea]. Laboratorio de Tecnología Educativa. Departamento de Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca. [Consulta: 15 de Enero del 2017]. Disponible en:

http://virus.usal.es/web/demo_microali/Saureus/SaureusPlaca.html

GAITAN I. *Pruebas bioquímicas para identificación de enterobacterias* [en línea]. 2011. [Consulta: 10 enero 2017]. Disponible en:

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwiQ2ajmJ_OAhVGJh4KHYhcBXgQFggeMAA&url=http%3A%2F%2Fecaths1.s3.amazonaws.com%2Fmicro%2F340329342.11-pruebas-bioqu3admicas-de-identificac3b3n-de-enterobacterias.pdf&usq=AFQjCNE1qworg7v8Z5CgKUFAjgq-Xivr2w&sig2=68NpYDCI3V2-zpHB1g8zZg

GARCIA, G.; *Contaminación del agua*. [en línea]. Ciencias de la Tierra y del Medio Ambiente (libro electrónico) [Consulta: 11 de Enero del 2017]. Disponible en: <http://ocw.unican.es/ciencias-de-la-salud/salud-publica-y-atencion-primaria-de-salud/otros-recursos-1/lecturas/bloque-iii/Contaminacion%20del%20agua.pdf>

GARCÍA, Pedro; et al. *Microbiología Clínica Aplicada* [en línea]. 3^{ra} edición. Madrid-España: Editorial Díaz de Santos, S.A, 1997, pp. 23. [Consulta: 10 enero 2017]. Disponible en: <https://books.google.com.ec/books?id=O1pigUGRprwC&pg=PA23&lpg=PA23&dq=Microscopia+de+las+Bacterias.++Garcia&source=bl&ots=SlOoiftABu&sig=Q>

GAVETADEMIESCRITORIO.COM.; *Disposición de los cocos* [blog]. 2013. [Consulta: 10 de Enero del 2017]. Disponible en:

<http://gavetasdemiescritorio.blogspot.com/2013/03/caracteristicas-generales-de-las.html>

GILES, A. *Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos* [en línea]. México: 2009. [Consulta: 10 enero 2017]. Disponible en:

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=3&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjfysx5oXPAhWCJh4KHXhpDmkQFggwMAI&url=http%3A%2F%2Fdepa.fquim.unam.mx%2Famyd%2Farchivero%2FTecnicBasicasCuentamohoslevaduras_6530.pdf&usg=AFQjCNHfx8Sv8eAuUb5ww2bU4tzOq0Nbg&sig2=I8Ror0WYniV3pfO6zSA

GONZÁLES, María. Staphylococcus epidermidis formador de biofilm en blefaroconjuntivitis, *Medigraphic Artemisa*, vol. 70.nº 1(2007), (México) pp 24-25

GOMH.UMH.ES.; *Fundamento de la prueba de la oxidasa* [en línea]. 2012 [Consulta: 11 de Enero del 2017]. Disponible en: <https://sites.google.com/a/gomh.umh.es/practicas-de-microbiologia/indice/identificacion-bacteriana/oxidasa>

GRANADOS PÉREZ, Raquel; & VILLAVARDE PERIS, M^a Carmen. *Microbiología. Bacteriología. Medios de cultivo y pruebas bioquímicas. Micología general. Parasitología general.* Tomo II. 2^a ed. Australia: Thomson Paraninfo, 2003, pp. 6-151

GRATACÓS M; et al. Marti. “Guía Técnica para la prevención para la prevención y control de Legionelosis en Instalaciones”. *Subdirección General de Sanidad Ambiental y Salud Laboral*, (2012), (España), pp. 4-5.

QUINTANA, A. *Antibióticos. Bases microbiológicas del uso de antimicrobianos* [en línea]. 2004. [Consulta: 10 enero 2017]. Disponible en:

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjLsPDuZzOAhWMPB4KHRITB0MQFgggnMAE&url=http%3A%2F%2Fwww.higiene.edu.uy%2Fcefa%2FLibro2002%2FCap%252028.pdf&usg=AFQjCNHeEc6S050bZ-5waWdnRDfL0lxNDQ&sig2=jGx5P_0md0dwdr748yA2OQ

HERNANDEZ. *Procedimiento Técnica de Coagulasa en tubo* [en línea]. 1993. [Consulta: 10 enero 2017]. Disponible en:

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=3&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwj9ZzZrZXOAhWDWh4KHU2LayQQFggqMAI&url=http%3A%2F%2Fwww.ispch.cl%2Fsites%2Fdefault%2Ffiles%2Fdocumento_tecnico%2F2011%2F08%2FPRT712.02026%2520V%25205%2520tecnica%2520coagulasa%2520en%2520tubo.pdf&usg=AFQjCNFBg5ts-TTF90XJGc5I76-RrTfjOg&sig2=Lzkus3sHYx8wbRmD7alFPQ

HERRERA, S.; Análisis microbiológico de los alimentos, identificación de aerobios mesófilos. [en línea]. Universidad Nacional de Callao 2013. [Consulta: 1 de Enero del 2017]. Disponible en: <https://es.scribd.com/doc/186747801/informe-aerobios-mesofilos>

HUERTAS, M.; *Prueba de la Optoquina*. [en línea]. Para técnicos de Laboratorio. 2014, p.1 [Consulta: 1 de Enero del 2017]. Disponible en: <http://paratecnicosdelaboratorio.blogspot.com/2014/10/prueba-de-la-optoquina.html>

INTRODUCCIÓN AL TERMALISMO. *Historia de los balnearios* [en línea]. 2006. [Consulta: 10 noviembre 2016]. Disponible en: https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwia_sycktbOAhXImh4KHSuTDmQQFggeMAA&url=http%3A%2F%2Fwww.sld.cu%2Fgalerias%2Fpdf%2Fsitios%2Frehabilitacionbal%2Fintroduccion_al_termalismo.pdf&usg=AFQjCNGI9nQCbzTYrCtqMapDkBaQVA5nA&sig2=MZt4hYngOTL80ADeEmyAjQ

LA TOLITA EXPRESS.; *Mapa de la provincia de Cotopaxi, Ecuador*. [en línea]. 2010 [Consulta: 04 de Enero del 2017]. Disponible en:

http://www.transporteturismoycarga.com/tours-turismo-videos-fotografia-noticiasturisticas-eventos-turisticos.php?tablajb=informacion_turistica&p=191&t=4.--Informacion-turistica-de-la-provincia-de-Cotopaxi---Latacunga-&

LABORATORIOS BRITANIA S.A. *E.M.B. Agar (con Eosina y Azul de Metileno)* [en línea]. Argentina: 2010. [Consulta: 06 agosto 2016]. Disponible en:

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwi04rKiiJTOAhWKGB4KHXY6AaQQFggeMAA&url=http%3A%2F%2Fwww.britanialab.com%2Fproductos%2F229_hoja_tecnica_es.pdf&usg=AFQjCNF2GV4wexRu8VYw3bnAgjnF9DismQ&sig2=-pJoZII2pBb54eVyO71g-Q

LABORATORIOS BRITANIA S.A. *MacConkey Agar* [en línea]. Argentina: 2015. [Consulta: 10 enero 2017]. Disponible en:

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=5&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwiK1t_njpTOAhXLqB4KHV3xC1IQFgg4MAQ&url=http%3A%2F%2Fwww.britanialab.com%2Fproductos%2FB23114%2520REV%252001-MAC%2520CONKEY%2520AGAR.pdf&usg=AFQjCNF2DfGIvp199k9X3khlF3cujWNkJw&sig2=c_vTyowC7E18FkWtsSxZlw

LABORATORIOS BRITANIA S.A. *Manitol Salado Agar* [en línea]. Argentina: 2015. [Consulta: 06 agosto 2016]. Disponible en:

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjL0Iu7_pPOAhVHlh4KHSlaAc8QFggiMAE&url=http%3A%2F%2Fwww.britanialab.com%2Fproductos%2FB02118%2520REV%252001MANITOL%2520SALADO%2520AGAR.pdf&usg=AFQjCNHIX38PWQarKO1HBQe8bVGAPFjIYA&sig2=p_vq97BG6Tk6lY3GWZ21EA

LABORATORIOS BRITANIA S.A. *Salmonella Shigella Agar* [en línea]. Argentina: 2015. [Consulta: 10 enero 2017]. Disponible en:

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwiywa69kpTOAhWKsh4KHV_QCq0QFggkMAE&url=http%3A%2F%2Fwww.britanialab.com%2Fproductos%2FB02138%2520REV%252001-SALMONELLA%2520SHIGELLA%2520AGAR.pdf&usg=AFQjCNHsjPGDenW31cMCZiKLEQEkwtiYsQ&sig2=cWzficbOHeuJX9zOyQcSoQ

LÓPEZ, L & TORRES C.; *Medios de Cultivo.*, [en línea]. Universidad Nacional del Nordeste, 2004 [Consulta: 06 de Enero del 2017]. Disponible en: <http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/tp4.pdf>

MACFADIN, Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica, 3ed, Panamericana, Argentina, 2003 pp 223-232

MACIAS, K.; *Pruebas Bioquímicas.* [en línea].2010 p 2-15 [Consulta: 06 de Enero del 2017]. Disponible en:<http://es.slideshare.net/ditadna/pruebas-bioquimicas-4317750>

MADIGAN, Michael; et al. Martinko. *Brock Biología de los microorganismos.* 10ª ed. Madrid: Pearson, 2004, pp. 1-1011.

MARAVER, Francisco. *Vademécum de las Aguas Mineromedicinales* [en línea]. España: 2008 p. 16 [Consulta: 03 de Enero del 2017]. Disponible en: http://pendientedemigracion.ucm.es/info/hidromed/fileadmin/user_upload/descargas/Vademecum-espanol.pdf

MARCHAD, E.; *Microorganismos indicadores de la calidad del agua de consumo humano en Lima Metropolitana* (tesis) (Biólogo) Universidad de Perú, DECANA DE AMERICA. Lima 2002. pp.9-12 [Consulta: 08 de Enero del 2017]. Disponible en: http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtualdata/tesis/basic/marchand_p_e/tesis_completo.pdf

MARIN R.; *Características físicas, químicas y biológicas de las aguas* [en línea] Empresa Municipal de Aguas de Córdoba S.A. (EMACSA). 2008 pp 6-7 [Consulta: 18 de Diciembre del 2016 Disponible en:

http://api.eoi.es/api_v1_dev.php/fedora/asset/eoi:48101/componente48099.pdf

MARTINELL, César. *Los baños medievales en el Levante Español. Cuadernos de Arquitectura* [en línea]. 2013. [Consulta: 10 noviembre 2016]. Disponible en: http://aguas.igme.es/igme/publica/libro75/pdf/lib75/in_06.pdf

MÉNDEZ FLORES, Avilio.; *Beneficios de las aguas termales* [blog]. España, Blog. Ciencias-Médicas, 2014. [Consulta: 10 de Enero del 2017]. Disponible en: <http://blog.ciencias-medicas.com/archives/853>

MERINO L. *Estructura Bacteriana* [en línea]. 2010. [Consulta: 10 enero 2017]. Disponible en: https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=10&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwi4kvyT8Y7OAhVFFx4KH3Y3OAAAYQFghXMAk&url=http%3A%2F%2Fecaths1.s3.amazonaws.com%2Fcatmicromed%2FAPUNTE%2520Morfologia%2520bacteriana.pdf&usq=AFQjCNFUncs7_QjASDDVHqhaPzQwcn_EQ&sig2=tfRXb7WcWMqL9yq6B_Xqtg

MORENO, C, et, al.; Mecanismos de resistencia antimicrobiana en patógenos respiratorios *Revista científica SCIELO*, v.69 n°2 (2009) (Santiago – Chile) pp. 1.

NAVARRA, U. *Cultivo de microorganismos*. [en línea] Microbiología General 2002, p. 3 4. [Consulta: 15 de Enero del 2017]. Disponible en: <http://www.unavarra.es/genmic/microgral/Tema%202002.%20Cultivo%20de%20microorganismos.pdf>

NAVARRO, Ferran MIRÓ, Elisenda & MIRELIS, Beatriz., *Lectura interpretada del antibiograma de enterobacterias* en línea]. Barcelona-España., 2010. [Consulta: 10 enero 2017]. Disponible en: <http://www.elsevier.es/esrevistaenfermedadesinfecciosasmicrobiologiaclinica28articulolectura-interpretada-del-antibiograma-enterobacterias-13184029>

NTE INEN 2178:2011., *Aguas. Minerales. Aguas. Minerales Naturales*

NTE INEN 2169 -1998: *Agua. Calidad del agua. Muestreo. Manejo y conservación de muestras.*

NTE INEN 2176 - 1998: *Agua. Calidad del agua. Muestreo. Técnicas de muestreo*

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS).; *Resistencia bacteriana.*[en línea] 2014. [Consulta1: 15 de Enero del 2017]. Disponible en: <http://www.who.int/features/qa/75/es/>

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). *Escherichia coli* [en línea]. 2016. [Consulta: 10 enero 2017]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/es/>

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). *Resistencia a los antimicrobianos* [en línea]. 2016. [Consulta: 10 noviembre 2016]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>

OTTO, Gerardo. *Estafilococcus* [en línea]. 2006. [Consulta: 10 enero 2017]. Disponible en: https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwuj5e3e2LzOAhXKOCYKHTO1BIsQFggkMAE&url=http%3A%2F%2Fwww.higiene.edu.uy%2Fcefa%2FLibro2002%2FCap%252017.pdf&usg=AFQjCNHbYTijEdqmRV_fhyrOodB3Sy-5_w&sig2=6oSqh2iZddnzFJ59pmLD7w

PACHECO, Pedro. *El Micrococcus* [en línea]. 2009. [Consulta: 10 enero 2017]. Disponible en: <http://es.slideshare.net/pedritopacheco/micrococcus>

PAREDES, F. & ROCA, J.; *Acción de los antibióticos.* [en línea] Perspectiva de la medicación antimicrobiana 2004, pp 1-8. [Consulta1: 10 de Enero del 2017]. Disponible en:<https://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=4&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwihkaqpqrRAhXJ7iYKHWrMB9UQFggguMAM&url=http%3A%2F2www.el>

sevier.es%2Fesrevistaoffarm4pdf13059414S300&usg=AFQjCNF1S4IoqQM3V0CtZMvkQkZJ
XfllSg&sig2=Zx7qOGJSZKH7mPKPIIJLVg

PASTOCALLE.; *Cascadas de Cunuyacu* [blog]. Ecuador 2012. [Consulta: 10 de Enero del 2017]. Disponible en: <http://pastocalleverdeaventura.blogspot.com/>

PEDRIQUE M. *Determinación de la sensibilidad de las bacterias a los antibióticos (antibiograma)*. [en línea] 2002. [Consulta: 10 enero 2017]. Disponible en: https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjzejd5_NAhWD0h4KHRs7AWoQFggeMAA&url=http%3A%2F%2Fwww.ucv.v.e%2Ffileadmin%2Fuser_upload%2Ffacultad_farmacia%2FcatedraMicro%2F10_Antibiograma.pdf&usg=AFQjCNHQ0pa0Q9wM3siG4zS1Xy2b_TLIZw&sig2=HooRDLCjvOcobEV47xyE3Q

PÉREZ D. "Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria", 22, 3, (1998), pp. 57-67.

PIREZ, M. & MOTA, M.; *Morfología y estructura bacteriana*. [en línea] Temas de bacteriología y virología médica. 2008, p. 2. [Consulta: 10 de Enero del 2017]. Disponible en: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/MorfologiayEstructuraBacteriana.pdf>

PORRAS, Jorge; et al. Nieto. *Calidad y contaminación de las aguas subterráneas en España* [en línea]. España: 1985. [Consulta: 10 enero 2017]. Disponible en: <http://aguas.igme.es/igme/publica/libro43/lib43.htm>

PRESCOTT; et al. Harley.; *Microbiología*. 5ª ed. Madrid: McGraw-Hill-Interamericana, 2004, pp. 29-30.

PROCEDIMIENTOS DIAGNÓSTICOS. *Procedimientos de identificación bacteriana. Sistemas manuales y automáticos. Últimas tendencias en identificación* [en línea]. Madrid: 2008. [Consulta: 10 enero 2017]. Disponible en: https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=3&cad=rja&uact=8&sqi=2&ved=0ahUKEwjRhZa5gY_OAhXDlh4KHfTWA20QFggvMAI&url=http%3A%2F%2Fwww.preparadores.eu%2Ftemamuestra%2FPTecnicos%2FDiagnostico.pdf&usg=AFQjCNGhxdbNS3-BakCtyUsfJuCCEjiDQQ&sig2=rtLQDBdXZDvlCBSoGm843w

PROCEDIMIENTOS EN MICROBIOLOGÍA CLÍNICA. *Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos* [en línea]. 2000. [Consultado: 10 enero 2017]. Disponible en:

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=8&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwirvsKrtabOAhUsJMAKHdhKBMEQFghNMAc&url=http%3A%2F%2Fcoesantseimc.org%2Fdocuments%2FM%25C3%25A9todosB%25C3%25A1sicos_SensibilidadAntibi%25C3%25B3ticos.pdf&usg=AFQjCNHT5kiWWMpSSKjDCea_AQrqxDWliQ&sig2=OoaMiR1e-m1e7r6XNem5Kw

QUISTIÁN, Hylary.; *Tipos y Funciones de los Medios de Cultivo.* [en línea] Microbiología 2014 [Consulta1: 10 de Enero del 2017]. Disponible en:<http://microbiologia3bequipo5.blogspot.com/2014/09/tipos-y-funciones-de-los-medios-de.html>

REYES, A. *Microbiología general, Escherichia coli* [en línea]. 2011. [Consulta: 10 enero 2017]. Disponible en: <http://www.uv.mx/personal/sbonilla/files/2011/06/Escherichia-coli-I.pdf>

RODÉS Oliver.; *Control de calidad de las aguas mineromedicinales.* [en línea] Panorama actual de las Aguas Minerales y Minero-medicinales en España 2001 [Consulta1: 10 de Enero del 2017]. Disponible en: <http://aguas.igme.es/igme/publica/pdfart3/control.pdf>

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

RODRIGUEZ, G. Temas de *Bacteriología y Virología médica*. España: 2000, pp, 274-275

RODRIGUEZ, G. Temas de *Bacteriología y Virología médica*. España: 2000, pp, 281-282

ROJAS, Mario. *Aguas termales de Atotonilco, Morelos, México, y sus beneficios terapéuticos* [en línea]. 2011. [Consulta: 10 de noviembre 2016]. Disponible en: http://www.tlahui.com/medic/medic32/termas_atotonilco.htm

RUBIO M.; *Agar almidón* [en línea] Medios de Cultivo en Microbiología Manual de Laboratorio.2016, p. 1 [Consulta: 13 de Enero del 2017]. Disponible en: <http://microbiologiamedica.web16.top/medios/medios-comunes/agar-almidon>

SALAZAR, P.; *Características generales del Staphylococcus aureus.* [en línea] Patología clínica y medicina de laboratorio 2014, pp. 28,30 [Consulta: 03 de Enero del 2017]. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2014/pt141e.pdf>

SÁNCHEZ J.; *Propiedades físicas y químicas del agua.* [en línea] Biomoléculas 2010 pp 5-6. [Consulta: 03 de Enero del 2017]. Disponible en: <http://www.iespando.com/web/departamentos/biogeo/web/departamento/2BCH/PDFs/02agua.pdf>

SANCHEZ, José. *Guía de las Instalaciones balnearias en España*, Madrid [en línea]. 2013. [Consulta: 10 de noviembre 2016]. Disponible en:<http://adezn.org/attachments/article/210/Capitulo%204%20%20%20Historia%20del%20termalismo%20Moderno.pdf>.

SCRIBD.; *Introducción y métodos microbiológicos.* [en línea] Concepto e historia de la microbiología 2010. p.1 [Consulta: 12 de Enero del 2017]. Disponible en: <https://es.scribd.com/doc/30061600/concepto-y-definicion-de-microbiologia>

SEMINARIO TINCIONES.; *Técnicas de tinción. Fundamentos* [en línea] Seminario Tinciones 2010. p.1 [Consulta: 12 de Enero del 2017]. Disponible en: <http://www.microinmuno.qb.fcen.uba.ar/SeminarioTinciones.htm>

SEVILLA, V. *Género Staphylococcus* [en línea]. 2006. [Consulta: 10 enero de 2017]. Disponible en: https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=8&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwi32pvIjJXPAhXFph4KHZ5UB9YQFghVMAC&url=http%3A%2F%2Fwww.higiene.edu.uy%2Fcefa%2F2008%2FStaphylococcus.pdf&usq=AFQjCNEPYOTrUu0E_PXWwfqasq_H99mPJg&sig2=lHmn-fl3jYVTwx1hIryaJA

SUSSMANN, O.et, al; *Resistencia bacteriana.* [en línea] Unidad de Infectología, Hospital Universitario San Ignacio. 2010 p. 1. [Consulta: 12 de Enero del 2017]. Disponible en: <http://med.javeriana.edu.co/publi/vniversitas/serial/v43n1/0026%20Resistencia.PDF>

TAMAYO COBA, Henry David. *“Plan de promoción y difusión turística para la Parroquia San Juan de Pastocalle, ubicado en el cantón Latacunga, provincia de Cotopaxi”* [en línea]. (Tesis). Universidad Técnica de Cotopaxi, Facultad de Ciencias Administrativas y Humanísticas, Ingeniería Comercial. Latacunga-Ecuador. 2012, pp 92-95. [Consulta: 10 enero 2017]. Disponible en: <http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/1570/1/T-UTC-1408.pdf>

TEJEDOR René.; *Microorganismos indicadores* [en línea] 2013. [Consulta: 09 de Enero del 2017]. Disponible en: <http://es.slideshare.net/christiangomezsalazar/4-microorganismos-indicadores>

TERMALISMO URUGUAY. *Historia de las aguas termales* [en línea]. 2016. [Consulta: 10 noviembre 2016]. Disponible en: <https://sites.google.com/site/termalismouruguay/the-team/quesonlasaguastermales/historia-de-las-aguas-termales>

TERMAS DE REYES.; *Clasificación de las aguas* [en línea] 2010 [Consulta: 03 Enero del 2017]. Disponible en:

http://www.termasdereyes.com/index.php?option=com_content&view=article&id=23&Itemid=143

TORO C.; *Mecanismos de acción y resistencia a antibióticos.* [en línea] Universidad de Chile, Facultad de Medicina 2008. [Consulta: 15 de Enero del 2017]. Disponible en: https://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwihkaqpqrRAhXJ7iYKHWrMB9UQFgghMAE&url=https%3A%22Fwww.uchile.cl%2Fmedicina%2F2008%2F2%2FOBMICROB1%2F1%2Fmaterial_docente%2Fbajar%2Fmaterial%2F187254&usg=AFQjCNGqXJ0pK7mSnPXefbJyQaAG8iP3Q&sig2=qKZ31YyGHUGS84FrWKcnEw

UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA. *Recuento Bacteriano y análisis de agua* [en línea]. 2011. [Consulta: 10 enero 2017]. Disponible en: https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=11&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwiqyYiIxpTOAhXFJx4KHd5uAisQFghQMAo&url=http%3A%2F%2Fwww.ramos.utfsm.cl%2Fdoc%2F530%2Fsc%2FLABORATORIO_3.pdf&usg=AFQjCNFPxenRCsrY1-OaO143gLjUgeK27A&sig2=xik8sZ6pfeO_HHRC11lv-g

URGES.; *Prueba de la Oxidasa, Prueba de la Catalasa.* . [en línea] 2012. [Consulta: 03 de Enero del 2017]. Disponible en: http://www.ugr.es/~pomif/pom-bac/pb-v/pb-v-3-catalasa_oxidasa.htm

VADEMECUM.; *Acido Nalidíxico, Noboviocina.* [en línea] 2005. [Consulta: 03 de Enero del 2017]. Disponible en: <http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/n039.htm>

LATACUNGA.; *Cascadas de Cunuyacu.* [en línea] Portal de Turismo 2012 [Consulta: 03 de Enero del 2017]. Disponible en:<http://www.vivelatacunga.com/cascadas-de-cunuyacu/>

WIKILIBROS., *Microbiología / Medios de cultivo,* [en línea] 2016. [Consulta: 03 de Enero del 2017]. Disponible en:

https://es.wikibooks.org/wiki/Microbiolog%C3%ADa/Medios_de_cultivo

ANEXOS

ANEXO A: Aguas termales de “CUNUYACU”



Fotografía N° 1: Letrero del parqueadero de ingreso a las aguas termales.
Realizado por: BENAVIDES Cyntia ,2017



Fotografía N° 2: Letrero de ingreso a las aguas termales.
Realizado por: BENAVIDES Cyntia ,2017



Fotografía N° 3: Aguas termales de “CUNUYACU”
Realizado por: BENAVIDES Cyntia ,2017

ANEXO B: Puntos de toma de muestra



Fotografía N° 4: Ojo de agua pequeño, dentro de una cueva. (M1)
Realizado por: BENAVIDES Cyntia ,2017



Fotografía N° 5: Vertiente grande (M2)
Realizado por: BENAVIDES Cyntia ,2017



Fotografía N° 6: Poza de las aguas termales (M3)
Realizado por: BENAVIDES Cyntia ,2017



Fotografía N° 7: Raspado ascendente en vertiente grande (M4)
Realizado por: BENAVIDES Cyntia ,2017

ANEXO C: Medición de parámetros in situ de las aguas termales.



Fotografía N° 8: Medición de la temperatura en el punto M2
Realizado por: BENAVIDES Cyntia ,2017



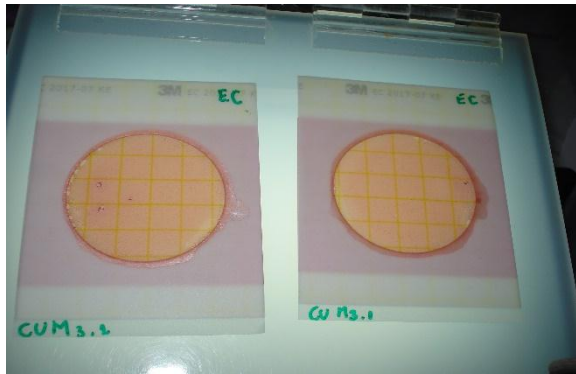
Fotografía N° 9: Medición pH.
Realizado por: BENAVIDES Cyntia ,2017

ANEXO D: Siembra de las muestras del agua termal.

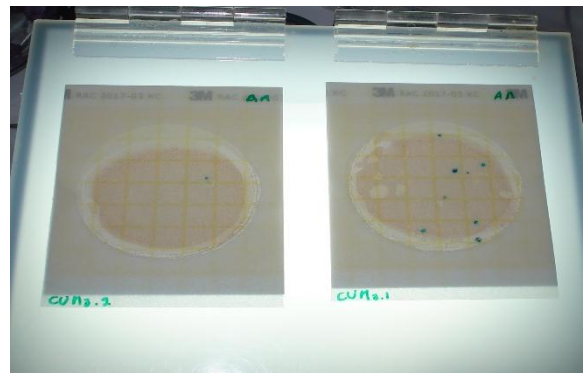


Fotografía N° 10: Siembra en las placas 3M Petrifilm, en el agar eosina azul de metileno y en el agar manitol salado.
Realizado por: BENAVIDES Cyntia ,2017

ANEXO E: Resultados del Recuento bacteriano 24-48 horas.



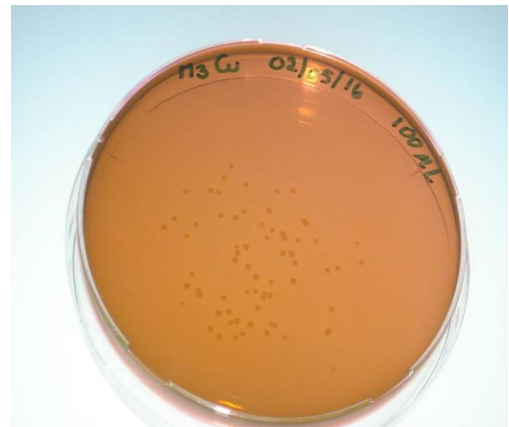
Fotografía N° 11: Placa Petrifilm para el recuento de *Escherichia coli* y Coliformes totales en los puntos M3.1 y M3.2
Realizado por: BENAVIDES Cyntia ,2017



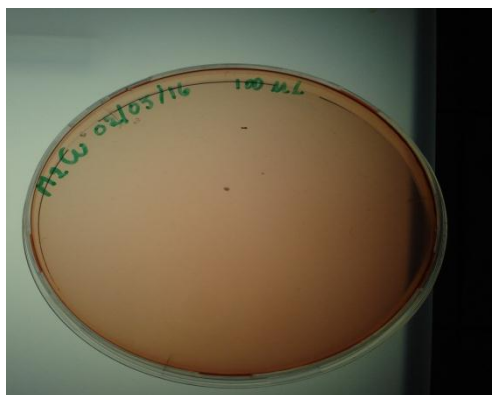
Fotografía N° 12: Placa Petrifilm para el recuento de *Staphylococcus aureus* en los puntos M3.1 y M3.2
Realizado por: BENAVIDES Cyntia ,2017



Fotografía N° 13: Placa Petrifilm para el recuento de *Staphylococcus aureus*
Realizado por: BENAVIDES Cyntia ,2017

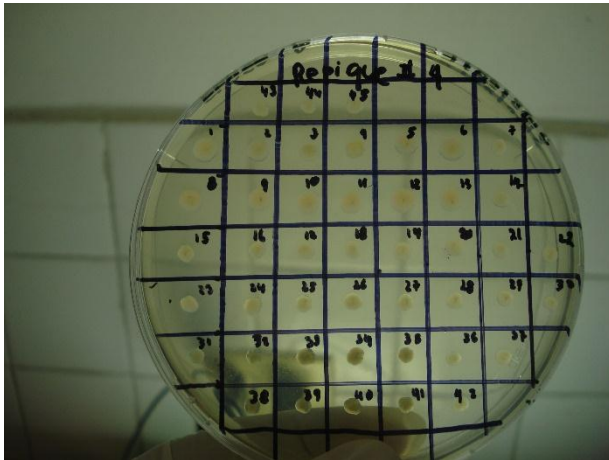


Fotografía N° 14: Crecimiento en agar eosina azul de metileno
Realizado por: BENAVIDES Cyntia ,2017

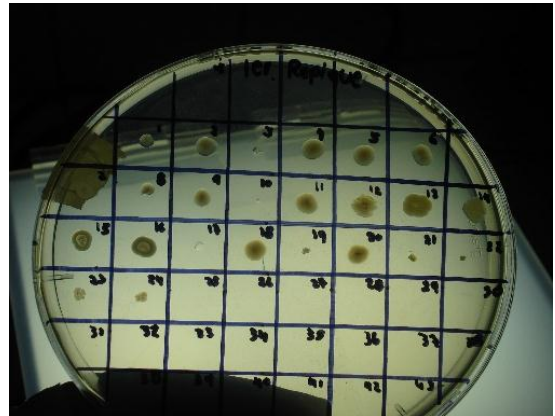


Fotografía N° 15: Crecimiento en manitol saldo
Realizado por: BENAVIDES Cyntia ,2017

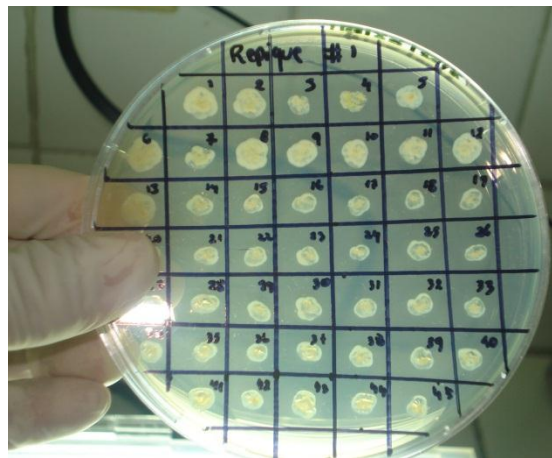
ANEXO F: Repiques de colonias obtenidas en las placas 3M Petrifilm y agares



Fotografía N° 16: Primer repique obtenido de las placas 3M Petrifilm en agar Mueller Hinton
Realizado por: BENAVIDES Cyntia ,2017

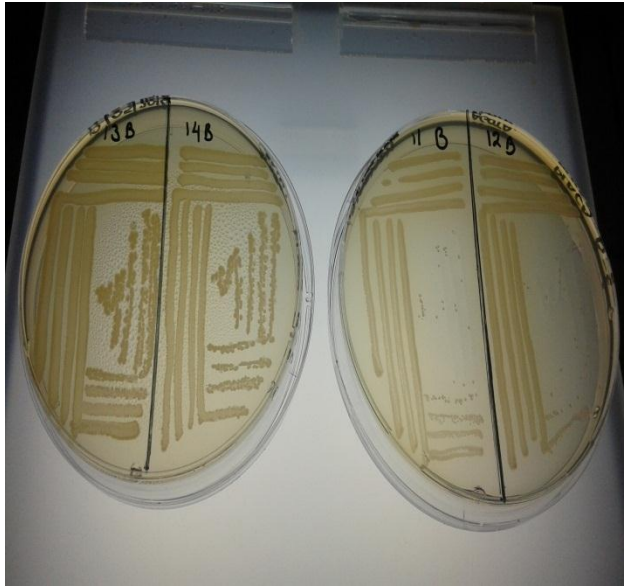


Fotografía N° 17: Primer repique obtenido a partir del agar manitol salado
Realizado por: BENAVIDES Cyntia ,2017



Fotografía N° 18: Primer repique obtenido a partir del agar eosina azul de metileno
Realizado por: BENAVIDES Cyntia ,2017

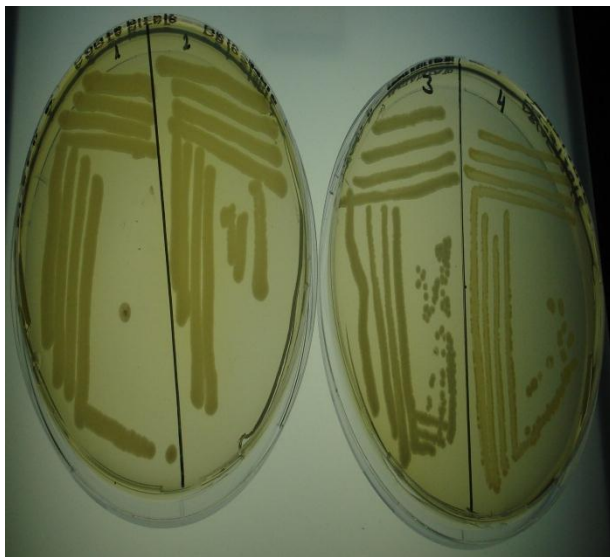
ANEXO G: Siembra por aislamiento obtenidas a partir de las colonias aisladas



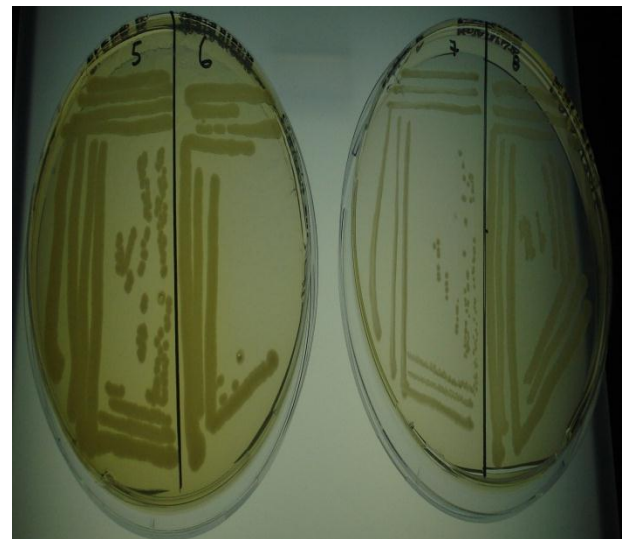
Fotografía N° 19: Siembra por agotamiento de estrías de los clones (11, 12, 13 y 14) B
Realizado por: BENAVIDES Cyntia ,2017



Fotografía N° 20: Siembra por agotamiento de estrías de los clones (15, 16, 18 y 19) B
Realizado por: BENAVIDES Cyntia ,2017



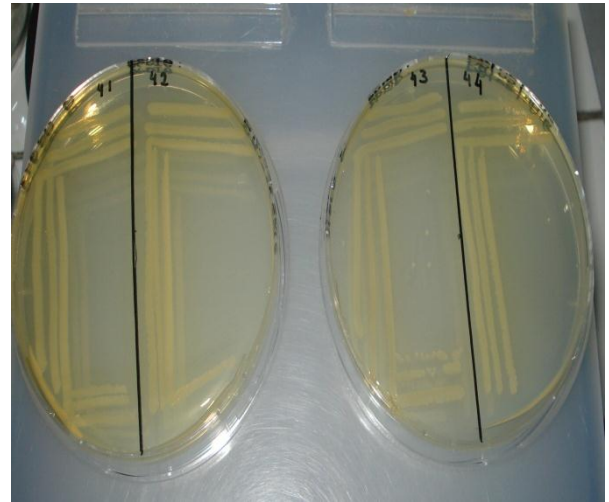
Fotografía N° 21: Siembra por agotamiento de estrías de los clones (1,2 ,3 y 4) A
Realizado por: BENAVIDES Cyntia ,2017



Fotografía N° 22: Siembra por agotamiento de estrías de los clones (5 6,7 y 8) A
Realizado por: BENAVIDES Cyntia ,2017

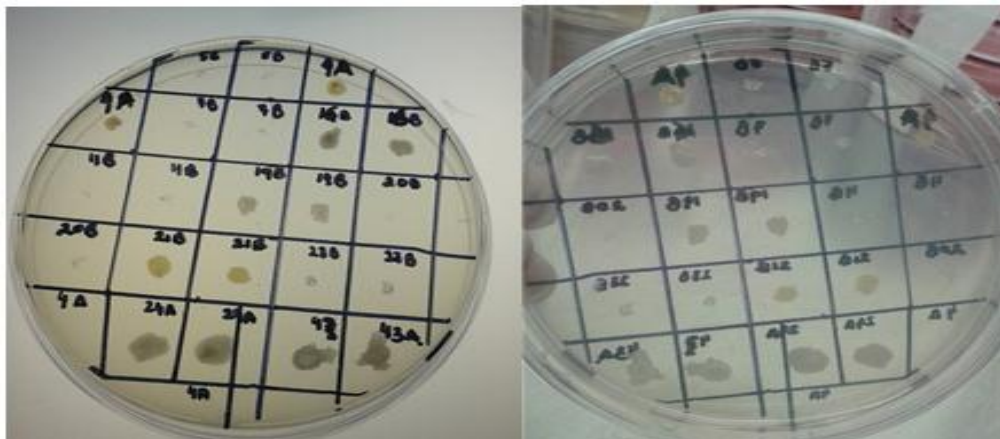


Fotografía N° 23: Siembra por agotamiento de estrías de los clones (9, 10, 11 y 12) C
Realizado por: BENAVIDES Cyntia ,2017



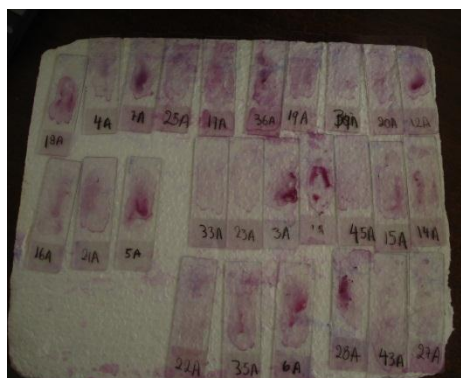
Fotografía N° 24: Siembra por agotamiento de estrías de los clones (5, 6, 7 y 8) A
Realizado por: BENAVIDES Cyntia ,2017

ANEXO H: Clones bacterianos puros escogidos para pruebas de identificación

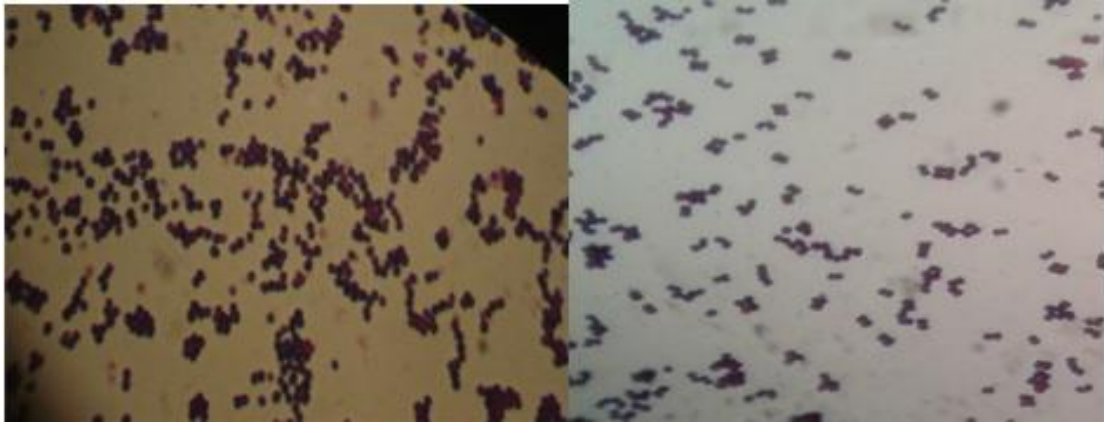


Fotografía N° 25: Clones bacterianos
Realizado por: BENAVIDES Cyntia ,2017

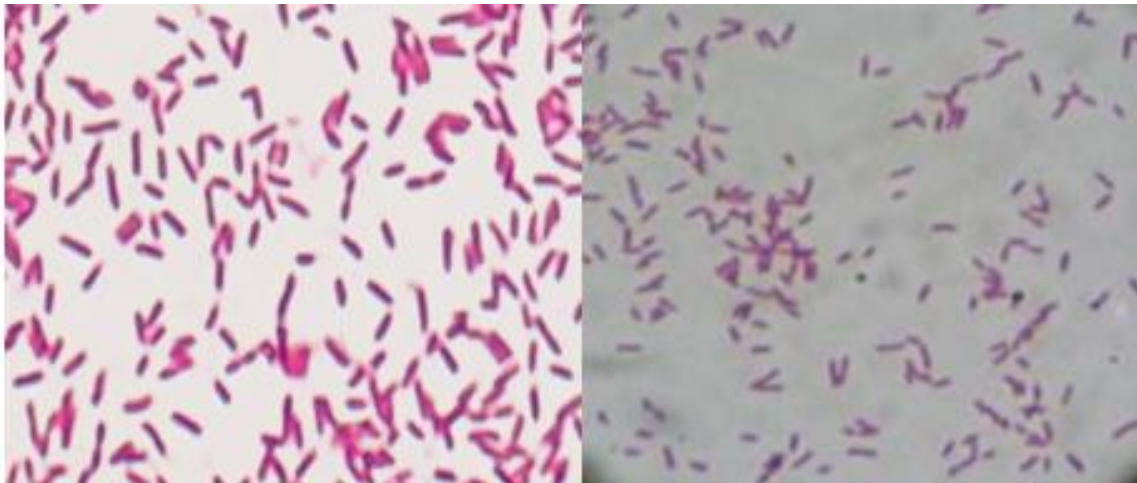
ANEXO I: Tinción Gram de los clones bacterianos



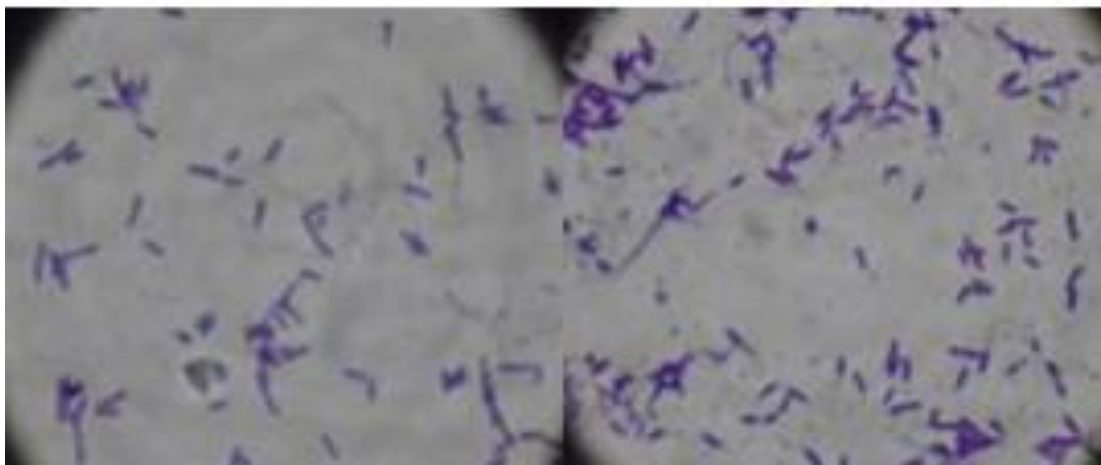
Fotografía N° 26: Placas de tinción Gram
Realizado por: BENAVIDES Cyntia ,2017



Fotografía N° 27: Cocos Gram positivos
Realizado por: BENAVIDES Cyntia ,2017

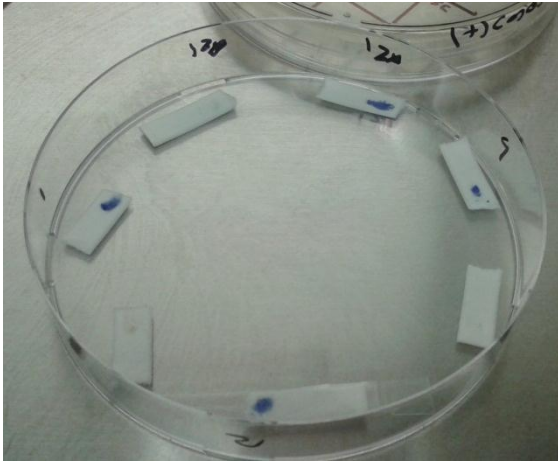


Fotografía N° 28: Bacilos Gram negativos
Realizado por: BENAVIDES Cyntia ,2017



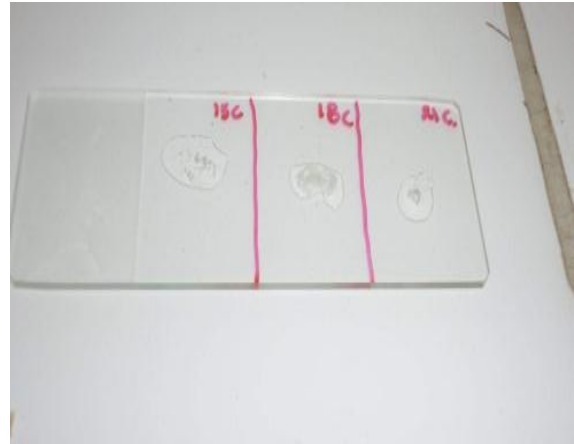
Fotografía N° 29: Bacilos Gram positivos
Realizado por: BENAVIDES Cyntia ,2017

ANEXO J: Prueba de la oxidasa y catalasa



Fotografía N° 30: Prueba de la oxidasa para identificación

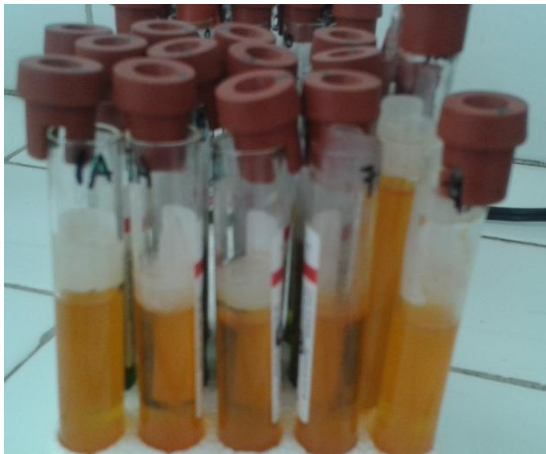
Realizado por: BENAVIDES Cyntia ,2017



Fotografía N° 31: Prueba de la catalasa para identificación

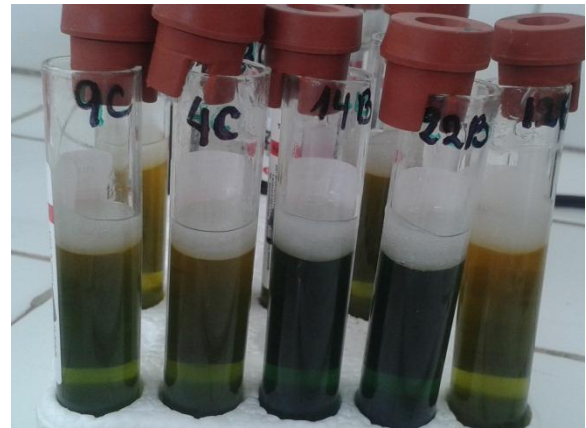
Realizado por: BENAVIDES Cyntia ,2017

ANEXO K: Prueba de Oxidación-Fermentación



Fotografía N° 32: Prueba de oxidación positiva

Realizado por: BENAVIDES Cyntia ,2017



Fotografía N° 33: Prueba de oxidación - fermentación inerte

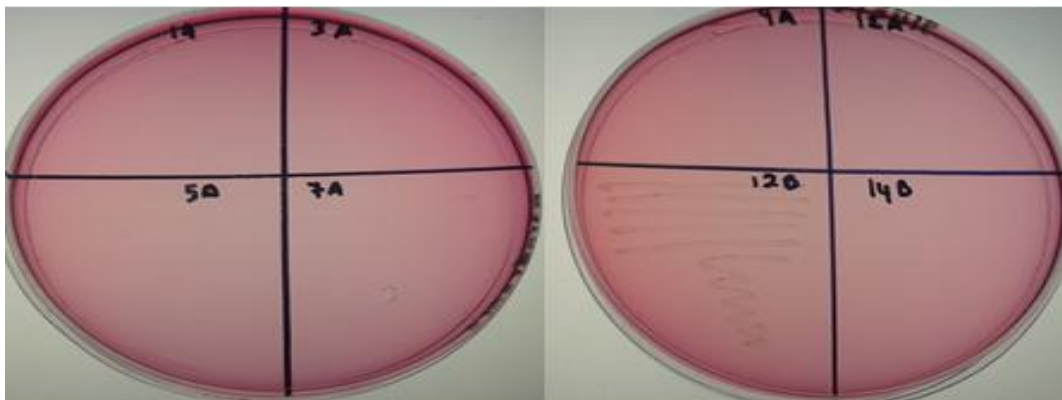
Realizado por: BENAVIDES Cyntia ,2017

ANEXO L: Siembra en agar sangre e identificación de los tipos de hemólisis

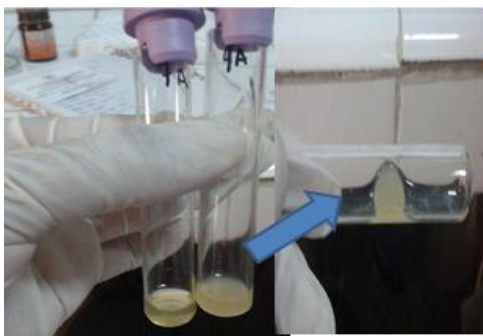


Fotografía N° 34: Beta hemólisis (derecha) y gamma hemólisis (izquierda)
Realizado por: BENAVIDES Cyntia ,2017

ANEXO M: Pruebas de identificación de cocos Gram positivos



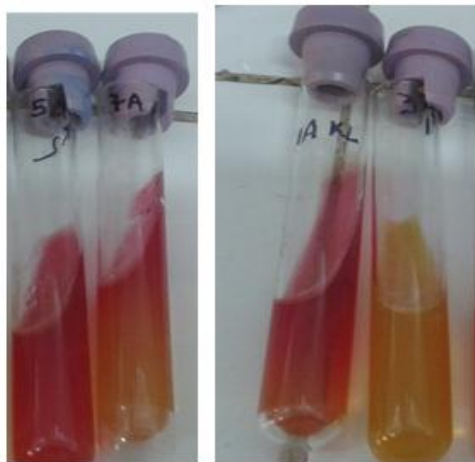
Fotografía N° 35: Resultados de la siembra en agar manitol
Realizado por: BENAVIDES Cyntia ,2017



Fotografía N° 36: Resultados de la prueba de la catalasa positiva (derecha) negativa (izquierda)
Realizado por: BENAVIDES Cyntia ,2017

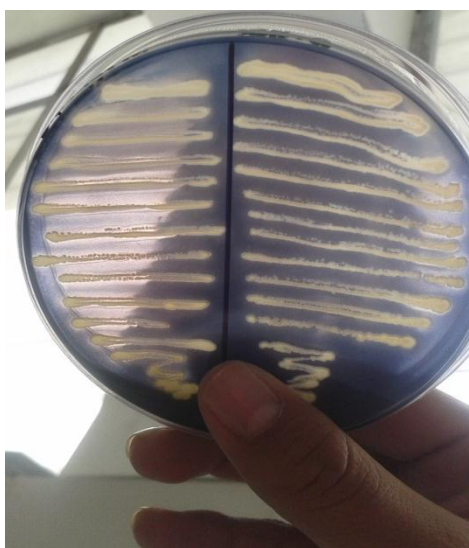


Fotografía N° 37: Resultados negativos en caldo hipersalino al 6.5%
Realizado por: BENAVIDES Cyntia ,2017



Fotografía N° 38: Resultados de la prueba de urea y kligler
Realizado por: BENAVIDES Cyntia ,2017

ANEXO L: Pruebas de identificación del bacilo Gam positivo



Fotografía N° 39: Resultados de la prueba de hidrolisis de almidón
Realizado por: BENAVIDES Cyntia ,2017



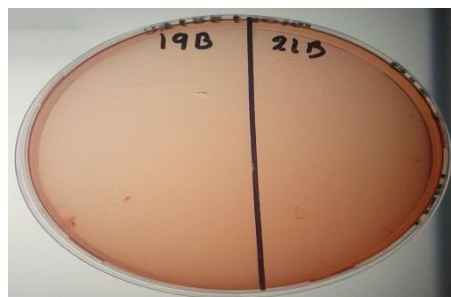
Fotografía N° 40: Resultados de la prueba hidrolisis de gelatina
Realizado por: BENAVIDES Cyntia ,2017



Fotografía N° 41: Resultados del crecimiento en agar eosina azul de metileno
Realizado por: BENAVIDES Cyntia ,2017

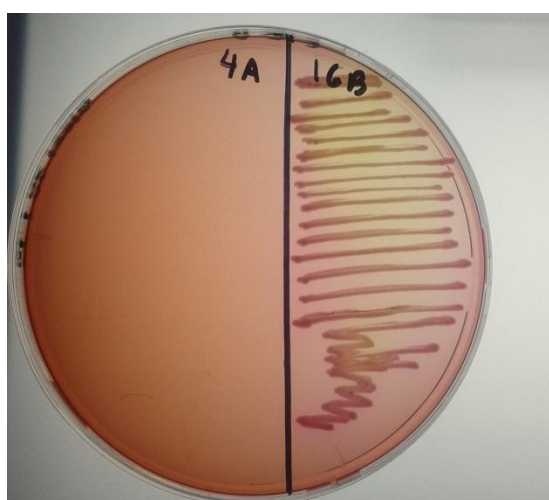


Fotografía N° 42: Resultados de las pruebas bioquímicas
 Realizado por: BENAVIDES Cyntia ,2017



Fotografía N° 43: Resultados de la siembra en agar MacConkey
 Realizado por: BENAVIDES Cyntia ,2017

ANEXO M: Pruebas de identificación de bacilos Gram negativos



Fotografía N° 44: Resultados de la siembra en agar MacConkey
 Realizado por: BENAVIDES Cyntia ,2017



Fotografía N° 45: Resultados de la siembra en agar eosina azul de metileno
 Realizado por: BENAVIDES Cyntia ,2017

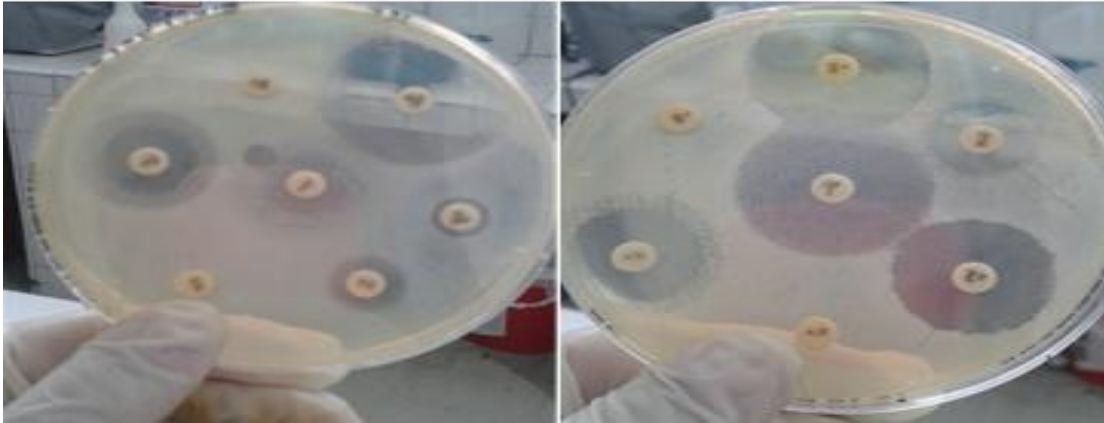


Fotografía N° 46: Resultados de la siembra en agar *Salmonella-Shigella*
 Realizado por: BENAVIDES Cyntia ,2017

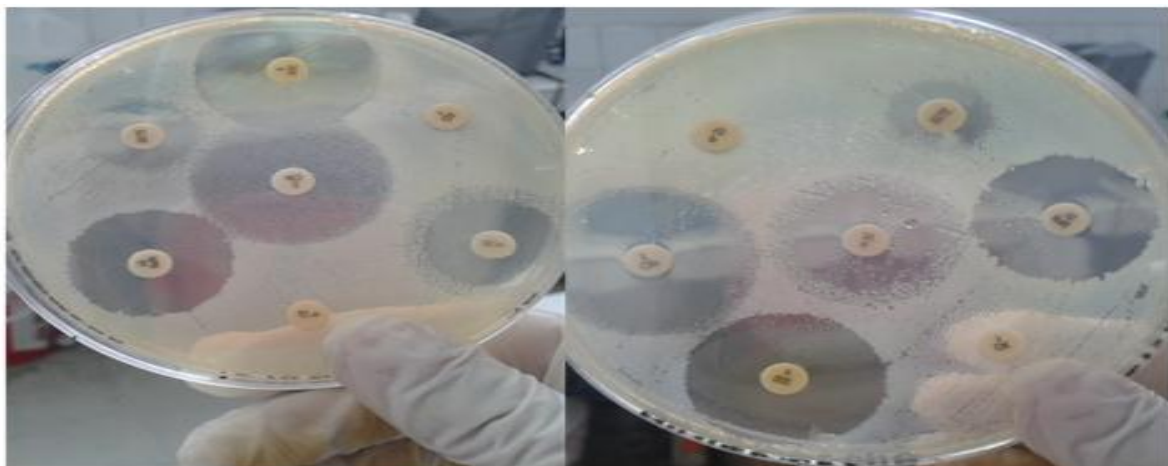


Fotografía N° 47: Resultados de la siembra en agar *Salmonella-Shigella*
 Realizado por: BENAVIDES Cyntia ,2017

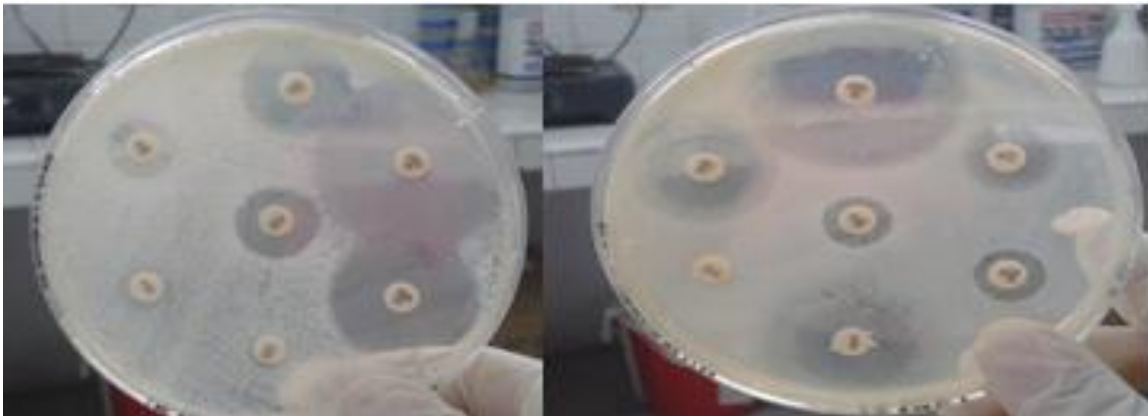
ANEXO N: Antibiogramas de los clones bacterianos aislados



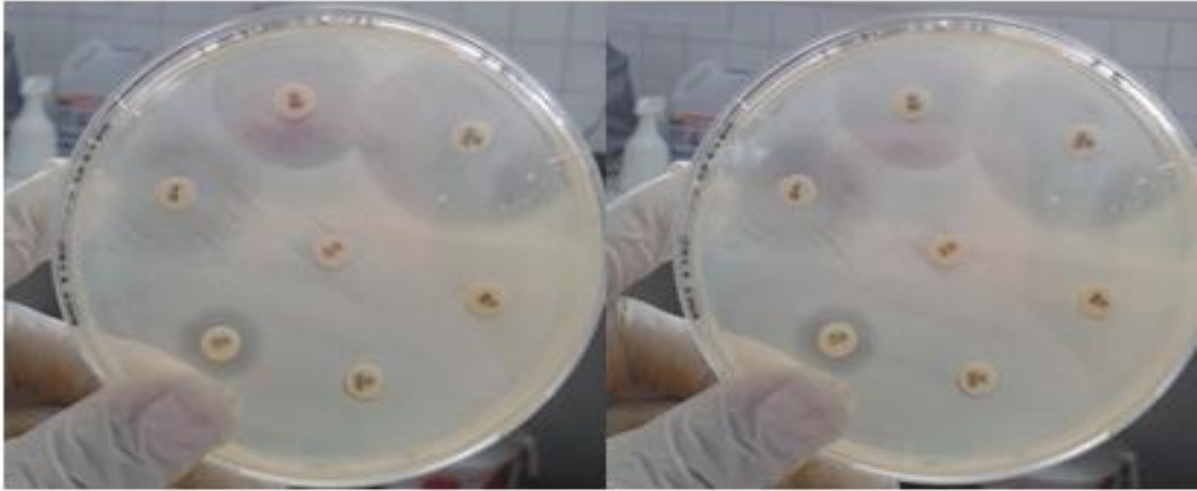
Fotografía N° 48: Resultados del antibiograma para clones A
Realizado por: BENAVIDES Cyntia ,2017



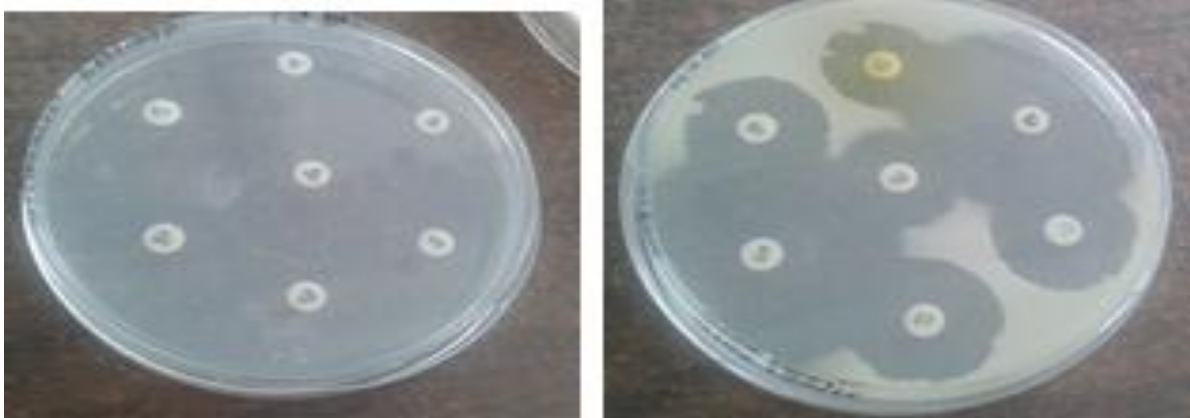
Fotografía N° 49: Resultados del antibiograma para clones A
Realizado por: BENAVIDES Cyntia ,2017



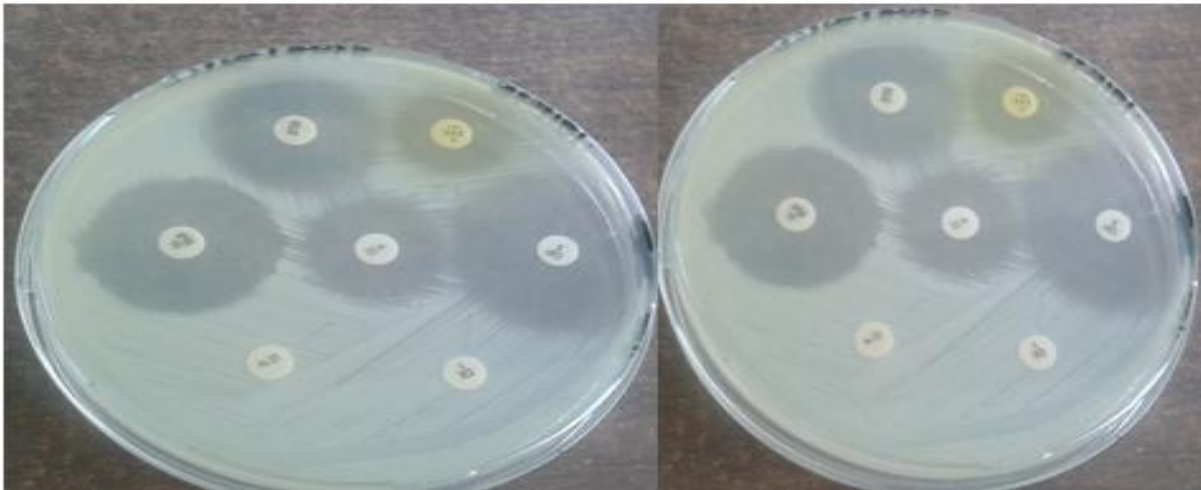
Fotografía N° 50: Resultados del antibiograma para clones B
Realizado por: BENAVIDES Cyntia ,2017



Fotografía N° 51: Resultados del antibiograma para clones B
Realizado por: BENAVIDES Cyntia ,2017



Fotografía N° 52: Resultados del antibiograma para clones C
Realizado por: BENAVIDES Cyntia ,2017



Fotografía N° 53: Resultados del antibiograma para el clon D
Realizado por: BENAVIDES Cyntia ,2017