



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“EVALUACIÓN DE LA MICROBIOTA Y RESISTENCIA A
ANTIBIÓTICOS EN LAS AGUAS TERMALES OJO DE
FANTASMA, EN LA COMUNIDAD PUNGAL DE PUELA DEL
CANTÓN PENIPE DE LA PROVINCIA DE CHIMBORAZO”**

TRABAJO DE TITULACIÓN

TIPO: PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

AUTORA: ERICA ISABEL GUAMAN GAVILANES

TUTOR: Dr. GERARDO EMILIO MEDINA RAMÍREZ

Riobamba – Ecuador

2019

©2019. Erica Isabel Guamán Gavilanes

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: “EVALUACIÓN DE LA MICROBIOTA Y RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN LAS AGUAS TERMALES OJO DE FANTASMA, EN LA COMUNIDAD PUNGAL DE PUELA DEL CANTÓN PENIPE DE LA PROVINCIA DE CHIMBORAZO” es de responsabilidad de la señorita Erica Isabel Guamán Gavilanes, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Trabajo de Titulación, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

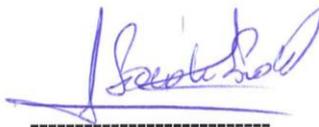
FECHA

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



11-02-2019

Dra. Sandra Escobar
MIEMBRO DEL TRIBUNAL



11-02-2019

Yo, Erica Isabel Guamán Gavilanes soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en este Trabajo de Titulación y el patrimonio intelectual del Trabajo de Titulación pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.



Erica Isabel Guamán Gavilanes

1804478974-9

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 mi madre por ser el apoyo más grande y ejemplo a seguir, por creer en mí aun cuando yo misma no lo hago 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 John, Jessica 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 mis amigos piojosos y vagotes por ser mi inspiración, mis fuerzas y mis ganas de salir adelante, por llegar a mi vida en el momento indicado, regalándome una sonrisa que me ayuda a no rendirme y seguir adelante persiguiendo mis metas y llenando mi corazón de alegría.

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

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.

A la Dra. Sandra Escobar por su cooperación, contribución, apoyo y paciencia como docente y amiga para llevar a cabo la presente investigación

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	XV
SUMMARY	XVI
INTRODUCCION	1
CAPÍTULO I	
1. MARCO TEÓRICO	4
1.1. Antecedentes de Investigación	4
1.2. Historia de las Aguas Termales	4
1.3. Tipos de agua termo-minerales.....	5
1.4 Aguas Termo-minerales en el Ecuador	6
1.5 Características físicas de las aguas termales	7
1.5.1 Clasificación de las aguas de acuerdo a su temperatura	7
1.5.2 Clasificación por su Relación Iónica	7
1.5.3 Clasificación de acuerdo al pH	8
1.6 Efectos de las aguas termales en el cuerpo humano:	8
1.7 Características Microbiológicas de las Aguas Termales.....	9
1.7.1 <i>Microbiología.</i>	9
1.7.2. <i>Clases de microorganismos patógenos en Aguas.</i>	9
1.7.3 Observación de las colonias bacterianas.....	10
1.7.3.1 Crecimiento en medio sólido	10
1.7.3.2 Crecimiento en medio líquido	11
1.7.3.3 Métodos de Identificación de Carga Microbiana en Agua	12
1.8 Características Organolépticos.....	12
1.8.1 <i>Color.</i>	12
1.8.2 <i>Olor y Sabor.</i>	12

1.9	Caracteres Fisicoquímicos de las Aguas Termales	13
1.9.1	<i>Turbiedad.....</i>	13
1.9.2	<i>Temperatura.</i>	13
1.9.3	<i>Sólidos Totales.....</i>	13
1.9.4	<i>pH.</i>	13
1.9.5	<i>Calcio.....</i>	14
1.9.6	<i>Cloruros.....</i>	14
1.9.7	<i>Magnesio.</i>	14
1.9.8	<i>Sulfatos.</i>	14
1.9.9	<i>Nitritos y Nitratos.</i>	15
1.9.10	<i>Hierro.</i>	15
1.10	Técnicas de Análisis Microbiológico Placas Petrifilm	15
1.11	Tinción Gram	16
1.11.1	Bacterias Gram negativas	16
1.11.2	Bacterias Gram positivas	17
1.12	Pruebas Bioquímicas	17
1.12.1	<i>Prueba de la Catalasa.</i>	17
1.12.2	<i>Prueba de la Oxidasa.</i>	18
1.12.3	<i>Citrato.....</i>	18
1.12.4	<i>Reacción de la Ureasa.....</i>	18
1.12.5	<i>Kligler Hierro Agar.</i>	18
1.12.6	<i>SIM o Sulfhídrico Indol Movilidad.</i>	18
1.13	Pruebas de Identificación de Microorganismos	19
1.13.1	<i>O.F. de Hugh & Leifson.</i>	19
1.14	Prueba de Resistencia Bacteriana a Antibióticos (Antibiograma).....	19
1.14.1	Resistencia antimicrobiana	19

CAPÍTULO II

2.	METODOLOGÍA	21
2.1	Ubicación	21
2.2	Metodología de la investigación:	22
2.3	Tipo y Diseño de la Investigación:	22
2.4	Unidad de Análisis	23
2.5	Población de Estudio	23
2.6	Materiales, Equipos, Reactivos	24
2.7	Métodos y Técnicas	25
2.7.1	Muestreo	25
2.7.2	Pruebas Físico- Químicas (Temperatura, pH).	27
2.7.3	Trasporte de las muestras.....	27
2.8	Análisis Microbiológico	27
2.8.1	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.....	27
2.8.1.1	Siembra en las placas 3M Petrifilm.....	27
2.8.1.2	Incubación de placas 3M Petrifilm.....	28
2.8.1.3	Interpretación de los resultados de las placas 3M Petrifilm	28
2.8.2	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.	29
2.8.3	Estabilización de los aislados bacterianos	30
2.8.3.1	Aislamiento de las colonias de microorganismos.....	30
2.8.3.2	Aislamiento por agotamiento de las colonias	31
2.8.4	Descripción macroscópica de los aislados bacterianos.....	32
2.9	Tinción Gram de las colonias puras Aisladas	32

2.10	Pruebas Bioquímicas	33
2.10.1	Prueba de la Oxidasa.	33
2.10.2	Prueba de la Catalasa.	34
2.10.3	Prueba de oxidación fermentación.....	35
2.11	Identificación de cocos Gram positivos	36
2.11.1	Fermentación y crecimiento en agar Manitol Salado	36
2.12	Identificación de Bacilos Gram Negativos	37
2.12.1	Crecimiento en agar Eosina Azul de Metileno	37
2.12.2	Crecimiento en agar MacConkey	38
2.12.3	Prueba en agar Kligler	38
2.12.4	Prueba del citrato	39
2.12.5	Interpretación de los Resultados:.....	39
2.12.6	Prueba de la urea.....	39
2.12.7	Medio SIM.....	40
2.13	Antibiograma	40
2.14	Identificación bacteriana	41

CAPÍTULO III

3.-	DISCUSION DE RESULTADOS OBTENIDOS EN LA INVESTIGACION.....	43
3.1.-	Determinación IN SITU de Parámetros: Temperatura y pH	43
3.2	ANALISIS MICROBIOLOGICO	43
3.2.1	Recuento de Bacterias Aerobias Mesófilas	43
3.2.2	Recuento de Bacterias en el Análisis Microbiológico E. coli./ Coliformes Totales.	45
3.2.3	Recuento de Bacterias Staphylococcus	46
3.2.4	Recuento de Mohos y levaduras.....	47
3.3	Recuento de Bacterias Gram (+) y Gram (-)	48

3.4	Descripción Macroscópica de las colonias Bacterianas aisladas de las Aguas Termales.....	49
3.5	Resultado de la determinación de pruebas bioquímicas para los clones puros Cocos Gram (+) y Bacilos Gram (-).....	51
3.6	Identificación de bacterias	54
3.6.1	Porcentaje de especies encontradas en las aguas termales.	56
3.7	Determinación de la Resistencia a Antibióticos de los aislados bacterianos identificados.	57
3.7.1	Porcentaje de Resistencia y Sensibilidad de Bacterias	63
	CONCLUSIONES	64
	RECOMENDACIONES	65
	BIBLIOGRAFIA	
	ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1: Tipos de aguas según su temperatura	7
Tabla 2-1: Clasificación de las Aguas Termales por su Relación Iónica.....	8
Tabla 3-1: Clasificación de acuerdo al pH.....	8
Tabla 1-2: Toma de muestra de las Piscinas Naturales.....	24
Tabla 2-1: Materiales de Laboratorio.....	24
Tabla 3-2: Resultados del crecimiento bacteriano del microorganismo en agar hierro de Kligler.	39
Tabla 4-2: Identificación Bacteriana.....	42
Tabla 1-3: Valores obtenidos para la temperatura y pH en los sitios de muestreo	43
Tabla 2-3: Recuento de Bacterias Aerobias Mesófilas	43
Tabla 3-3: Recuento de Bacterias E. coli y Coliformes Totales	45
Tabla 4-3: Resultados de la estimación del número de Staphylococcus.....	46
Tabla 5-3: Recuento de Mohos y levaduras.....	47
Tabla 6-3: Recuento de Bacterias Gram (+) y Gram (-)	48
Tabla 7-3: Morfología macroscópica de las colonias bacterianas de la muestra M1	49
Tabla 8-3: Morfología macroscópica de las colonias bacterianas de la muestra M2.....	50
Tabla 9-3: Morfología macroscópica de las colonias bacterianas de la muestra M3.....	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1: Características de bacterias en medio solido.....	11
Figura 1-2: Ubicación del Manantial	21
Figura 2-2: Ubicación de las Fuentes	22
Figura 3-2: Siembra en las placas 3M Petrifilm	30
Figura 4-2: Aislamiento por agotamiento de las colonias	32
Figura 5-2: Tinción Gram de las colonias puras Aisladas.	33
Figura 6-2: Pruebas Bioquímicas.....	33
Figura 7-2: Prueba de la Oxidasa.....	34
Figura 8-2: Prueba de la Catalasa	35
Figura 9-2: Prueba de óxido-fermentación es Hugh-Leifson, O-F	36
Figura 10-2: Fermentación y crecimiento en agar Manitol Salado.....	37
Figura 11-2: Crecimiento en agar Eosina Azul de Metileno	37
Figura 12-2: Crecimiento en agar MacConkey.....	38

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-3: Recuento de Bacterias de Aerobias Mesófilas	44
Gráfico 2-3: Recuento de Bacterias en el Análisis Microbiológico E. coli / Coliformes T. ...	45
Gráfico 3-3: Resultados de la estimación del número de Staphylococcus.....	47
Gráfico 4-3: Recuento de Mohos y levaduras.....	48
Gráfico 5-3: Recuento de Bacterias Gram (+) y Gram (-).	49
Gráfica: 6-3: Porcentaje de especies encontradas en las aguas termales.....	56

RESUMEN

El presente trabajo tiene como objetivo la evaluación de la Microbiota y la Resistencia a Antibióticos de las bacteria aisladas a partir de las aguas termales Ojo de Fantasma del cantón Penipe, Provincia de Chimborazo, la investigación se desarrolló en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, realizando la cuantificación de bacterias en tres piscinas naturales utilizando el método 3M Petrifilm de (*E. coli/ Coliformes*, *Staphylococcus*, *Aerobias Mesofilas*, mohos y levaduras), incubando a temperaturas de 44°C y 37°C a partir de los clones obtenidos, se realizó cuatro repiques para obtener 41 clones puros, para un estudios posterior de su descripciones macroscópicas, Tinción Gram donde se obtuvieron 33 clones (80%) Bacilos Gram (-) y ocho clones (20%) Cocos Gram (+). La caracterización bioquímica, identificación bacteriana: 11 clones *Pseudomonas aeruginosa*, seis *Escherichia coli*, cinco *Enterobacterias aerogenes*, cinco *Aeromonas schubertii*, cinco *Aeromonas schubertii*, tres *Pseudomonas stutzeri*, tres *Brevundimonas*, tres *Staphylococcus aureus*, tres *Micrococcus luteus* y dos *Enterococcus flavescens*. La determinación de la Resistencia a Antibióticos de los clones aislados mostraron las bacterias Gram negativas presentaron resistencia múltiple frente a ampicilina, penicilina, amoxicilina/ácido clavulánico y cefalotina fueron: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, mientras en los cocos Gram positivo *staphylococcus aureus*, fueron resistentes a ampicilina y penicilina, demostrando así la presencia de una microbiota patógena de alto riesgo sanitario para los usuarios. Se recomienda a la comunidad encargada del turismo local tomar las medidas necesarias para mejorar la calidad de las aguas termales.

PALABRAS CLAVE: <BIOQUÍMICA>, < EVALUACION DE LA MICROBIOTA>, <IDENTIFICACION BACTERIANA>, <ANTIBIOGRAMA>, < RESISTENCIA ANTIBIOTICA >, <AGUAS TERMALES >, <PENIPE(CANTON) >.



SUMMARY

The present work has as purpose the Microbiota and Resistance Evaluation to the isolated bacteria antibiotics from hot springs ghost's eye of the Penipe canton, Chimborazo Province, the research was carried out by the Laboratory of the Science Faculty Microbiology of the Higher Polytechnic School of Chimborazo, performing the quantification of bacteria in three natural pools using the 3M Petrifilm method (E. coli / Coliformes, Staphylococcus, Mesophilic Aerobias, molds and yeasts), incubating at temperatures of 44 ° C and 37 ° C. ° C from the clones obtained, four rings were made with the finality to obtain 41 pure clones, for further studies of their macroscopic descriptions, Gram stain where 33 clones (80%) Gram (-) Bacilli and eight clones (20%) were obtained) Cocos Gram (+). The biochemical characterization, bacterial identification: 11 clones Pseudomonas aeruginosa, six Escherichia coli, five Enterobacteria aerogenes, five Aeromonas schubertii, five Aeromonas schubertii, three Pseudomonas stutzeri, three Brevundimonas, three Staphylococcus aureus, three Micrococcus luteus and two Enterococcus faecalis. The determination of the Antibiotics Resistance of the isolated clones showed the Gram negative bacteria showed multiple resistance against ampicillin, penicillin, amoxicillin / clavulanic acid and cefalotin were: Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, while in Gram positive cocci Staphylococcus aureus, were resistant ampicillin and penicillin, thus demonstrating the presence of a pathogenic microbiota of high health risk for users. It is recommended that the community responsible for local tourism take the necessary measures to improve the hot springs quality.

KEY WORDS: <BIOCHEMISTRY>, <EVALUATION OF THE MICROBIOTE>, <BACTERIAL IDENTIFICATION>, <ANTIBIOGRAM>, <ANTIBIOTIC RESISTANCE>, <THERMAL WATERS GHOST EYE>, <PENIPE (CANTON)>.



INTRODUCCIÓN

Al ser el agua un recurso fundamental para la vida, el uso de la misma, tanto en cantidad como en calidad es un requisito indispensable para una óptima vida de las personas, para conservar su salud, conservación de la biodiversidad, uso terapéutico, producción de alimentos, etc.

En la Constitución del Ecuador se reconoce el derecho de los ciudadanos al agua, derecho que debe ser garantizado mediante la adopción de medidas de preservación y uso racional de las fuentes de agua. (Inamhi, 2011, p. 5).

Para evaluar la relación existente entre la calidad del agua y la salud humana, es preciso evaluar la presencia de microorganismos en el agua, sus efectos positivos o negativos y la posibilidad de aplicar una desinfección, entonces el concepto de microbiología según Apella, es una ciencia que estudia seres vivos de tamaño microscópico que existen como células aisladas o asociadas. (Apella et al., 2015; Araujo et al., 2015, p.34).

De igual manera es preciso conocer que la calidad del agua puede llegar a ser alterada fácilmente debido a varios factores ya sean estos físicos, químicos o biológicos, en el caso de este último la contaminación con microorganismos patógenos ocasionar enfermedades en la población que de una u otra forma hace uso del agua que actúa como vehículo de transmisión de microorganismos. (Andueza, 2014).

Por esta razón resultó trascendental realizar la Evaluación de la Microbiota y Resistencia a Antibióticos de los clones aislados de las aguas termales ojo de fantasma, en la comunidad Pungal de Puela del Cantón Penipe de la Provincia de Chimborazo, con el objetivo de determinar la carga bacteriana autóctona y alóctona existente en esta fuente, y la resistencia bacteriana a antibióticos, y en el caso de ser necesario sugerir acciones correctivas para que la carga bacteriana de esta fuente no cause daños en la salud de la población.

En este trabajo de investigación se realizó la cuantificación de bacterias aerobias mesófilas, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, coliformes, mohos y levaduras mediante el método de Placas 3M™ Petrifilm™, posteriormente se sembraron bacterias seleccionadas al azar en agares selectivos (Agar Manitol Salado) y diferenciales (Agar MacConkey, Agar Eosina azul de Metileno) con el fin de obtener clones puros. Una vez obtenidos los clones se realizaron pruebas fisiológicas y bioquímicas para identificar las principales especies bacterianas que fueron aisladas y que se encuentran presentes en las aguas termales. (Macfaddin, 2003, p. 733).

Una vez realizada la evaluación microbiológica de las aguas termales en este trabajo de investigación se determinó la resistencia y sensibilidad a varios antibióticos, de algunos clones aislados e identificados, de acuerdo a la metodología de Kirby Bauer de difusión en disco. (Núñez, 2015, p.39).

OBJETIVOS

General:

Evaluar la microbiota y la resistencia a antibióticos en las aguas termales Ojo de Fantasma, en la comunidad Pungal de Puela del Cantón Penipe de la provincia de Chimborazo

Específicos:

Hacer la evaluación de la temperatura y pH de las 3 fuentes.

Identificar el género y especie de los clones seleccionados.

Aislar los diferentes microorganismos que se encuentran formando parte de la microbiota de las fuentes.

Determinar la Resistencia a Antibióticos de los clones seleccionados en el presente estudio.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes de Investigación

Los pueblos antiguos de los Andes reconocían al agua como un ser vivo involucrado dentro de su cultura como formadora de vida. Los Incas consideraban al agua como un regalo de Wiracocha el Dios todopoderoso quien creó el universo entero. (Comunidad Andina, 2010, p.12)

Durante el siglo XIX se realizaron avances en los estudios de la hidroterapia en Alemania siendo los primeros Bunsen y Kirchoff, quienes encontraron que los manantiales de aguas termales tenían una riqueza mineral. (Salas 2000: p.1).

Después del descubrimiento de los manantiales minerales, 1920 España, inicia la investigación de las posibles enfermedades patógenas ocasionadas por el uso de estas aguas minerales. (Salas 2000: p.1).

El INAMHI, en 2015 realiza un estudio sobre las aguas subterráneas como un recurso económico y turístico en el país, hacen un inventario de la mayor parte de las fuentes termales presentes en el país, enfatizando su estudio en los parámetros físicos, químicos y económicos de las mismas. (Burbano., et al. 2015. P.7).

1.2. Historia de las Aguas Termales

Los beneficios terapéuticos de las aguas que emergen del suelo tiene inicios Prehistóricos, periodo en el que se consideraba regalos sobrenaturales y divinos brindados por los Dioses. En las cercanías de las aguas termales se construían templos y dólmenes que eran usados como arcos de entrada. (Instituto Geológico y Minero de España , 2017)

En la época de magnificencia en la edad antigua bajo el dominio Romano, se originaron piscinas y balnearios en gran cantidad. El manantial “Las Burgas de Ourense” es uno de los manantiales públicos más importantes de la época, constituido por 3 fuentes con aguas cuya temperatura era

de 60° C por lo que según cristianos de la época lo asimilaban con el infierno. Antes del régimen Romano los manantiales eran lugares sagrados cuyo origen se le atribuía al Dios acuático “Revvé Anabaraego”. (Instituto Geológico y Minero de España , 2017)

En la Edad Media el uso de los manantiales se vuelve exclusivo de órdenes religiosas y militares como “Los Caballeros de San Juan y Santiago”, que las usaron para el tratamiento de heridas y enfermedades cutáneas leves. (Instituto Geológico y Minero de España , 2017)

La Edad Moderna presentó un renacer en el uso de los manantiales, además inició el estudio científico de sus bondades terapéuticas. La Fuente Santa, manantial ubicado en las Islas Canarias es considerada como una de las aguas más antiguas usadas por miles de visitantes de diferentes lugares de América y Europa. Su fama llevó a que sus aguas fueran exportadas en barriles hacia el nuevo mundo para tratar enfermedades como: sífilis, lepra y la gota. (Instituto Geológico y Minero de España , 2017)

En la actualidad por toda Europa las aguas termales vuelven a gozar de cierta popularidad y resurgen los balnearios, exceptuando el paréntesis en su actividad que supuso la guerra. Desde finales del Siglo XX se han remodelado algunos de los existentes y se han abierto al público nuevos establecimientos, que hoy en día combinan su carácter medicinal con una oferta de ocio enfocada al turismo. (Instituto Geológico y Minero de España , 2017)

En las últimas décadas del Siglo XX cabe destacar la aparición en el mercado de las aguas de bebida envasada, que en España son mayoritariamente aguas minerales: agua mineral natural y en menor medida agua de manantial. Anteriormente ya existían las aguas minerales envasadas pero su uso era minoritario ya que se trataba de aguas minero-medicinales, restringidas a un uso terapéutico. (Instituto Geológico y Minero de España , 2017)

1.3. Tipos de agua termo-minerales

El agua mineral es aquella de alto contenido de minerales, así como de otras sustancias, a la cual se le atribuyen propiedades terapéuticas. Como tal, puede obtenerse de manera natural en sus fuentes, los llamados manantiales, o mediante un proceso. Actualmente, el agua mineral es un producto de valor comercial y existen miles de empresas alrededor del mundo que se dedican a su embotellamiento y distribución. (Junta de Andalucía, 2013)

Como agua subterránea se designa aquella que se encuentra debajo de la superficie continental, en el subsuelo, alojada en los acuíferos. Como tal, puede ocupar poros o grietas de ciertos tipos de suelos o rocas que la absorben como una esponja, o puede encontrarse recorriendo galerías o cavidades subterráneas. Es una fuente fundamental de abastecimiento de agua dulce. (Junta de Andalucía, 2013)

Como Agua Termal se llama aquellas aguas que salen del suelo con más de 5°C sobre la temperatura superficial. Estas aguas proceden de capas subterráneas de la Tierra que se encuentran a mayor temperatura, las cuales son ricas en diferentes componentes minerales y permiten su utilización en la terapéutica como baños, inhalaciones, irrigaciones, y calefacción. Por lo general se encuentran a lo largo de líneas de fallas ya que a lo largo del plano de falla, las aguas subterráneas se calientan y al llegar a cierta profundidad, suben después en forma de vapor (que puede condensarse al llegar a la superficie, formando un géiser) o de agua caliente. (Junta de Andalucía, 2013)

Existen dos tipos de aguas termales dependiendo de su origen geológico, las magmáticas y las telúricas. El tipo de terreno del que aparecen es una de las principales diferencias entre ambas las aguas magmáticas nacen de filones metálicos o eruptivos, mientras que las telúricas pueden aparecer en cualquier lugar. (Junta de Andalucía, 2013)

1.4 Aguas Termo-minerales en el Ecuador

El Ecuador se encuentra localizado dentro del Círculo de Fuego del Pacífico, y debido a los movimientos de las placas internas de la Tierra, permiten que la actividad magmática y los elevados flujos térmicos generados en la corteza terrestre se pongan en contacto con las aguas subterráneas que circulan a grandes profundidades; adquiriendo así un grado geotérmico alto que al llegar a la superficie se manifiestan como aguas calientes, ligadas especialmente a rocas volcánicas continentales y depósitos glaciares entre otros. (Inamhi, 2015)

Ante la insuficiente disponibilidad de información actualizada, el INAMHI, a través del Grupo de Estudios Hidrogeológicos, consideró de importancia fundamental, realizar el inventario y monitoreo de fuentes termominerales del Ecuador, como un aporte al conocimiento de los recursos hídricos del país y específicamente en este campo. (Inamhi, 2015)

En el Ecuador, a las fuentes de aguas con características termo minerales se les atribuye propiedades curativas y relajantes, además se las relaciona con el misticismo y la leyenda; y son en la actualidad destinos turísticos y balneológicos. (Inamhi, 2015)

1.5 Características físicas de las aguas termales

La temperatura de las aguas magmáticas es más elevada que la de la telúrica. La primera tiene por lo general temperaturas mayores a los 50° C, mientras que las de origen telúrico pocas veces lo hacen. Por otro lado, gracias a que las aguas telúricas son filtradas, estas poseen menor cantidad de mineralización que las magmáticas. Los elementos más comúnmente encontrados en las aguas magmáticas son arsénico, boro, bromo, cobre, fósforo y nitrógeno. Las aguas telúricas tienen por lo general bicarbonatos, cloruros, sales de calcio y otros. (García, 2013)

1.5.1 Clasificación de las aguas de acuerdo a su temperatura

La temperatura es la principal característica de las aguas termo-minerales, por lo que se verifica en el origen. (Inamhi, 2015).

Por lo general, se consideran termales en relación con la temperatura, aquellas aguas subterráneas que emergen, con una temperatura mayor a 5°C que la temperatura media anual del ambiente:

Tabla 1-1: Tipos de aguas según su temperatura

TIPO DE AGUAS	TEMPERATURA
Aguas Hipertermales	Más de 50° C
Aguas Meso termales o calientes	De 35 ° a 45° C
Aguas Hipotermales o poco frías	De 21 ° a 35 ° C
Aguas frías	Menos de 20 ° C

Realizado por: Inamhi, 2013

1.5.2 Clasificación por su Relación Iónica

La Relación Iónica en valores según la Presión Osmótica. La presión osmótica del agua mineral está relacionada con la cantidad de iones disueltos en milimoles (concentración molar). Las aguas que tienen una concentración molar de 303 mmol/L (milimoles por litro) poseen una presión osmótica similar a la del suero sanguíneo (aguas minerales isotónicas):

Tabla 2-1: Clasificación de las Aguas Termales por su Relación Iónica

TIPOS DE AGUAS	CONCENTRACION
Hipotónicas	Concentraciones < 300 mmol/l
Isotónicas	Concentraciones = 300 mmol/l
Hipertónicas	Concentraciones >300 mmol/l

Realizado por: Karakolev, 1984

1.5.3 Clasificación de acuerdo al pH

De acuerdo a la Norma Cubana de Agua Mineral (NC 93-01-218: 1995), de acuerdo al pH de las aguas termales se clasifican en:

Tabla 3-1: Clasificación de acuerdo al pH

AGUAS	pH
Acidas	con pH menor de 6.8
Neutras	con pH entre 6.8 y 7.2
Alcalinas	con pH superior a 7.2

Realizado por: (Norma Cubana, 1995)

1.6 Efectos de las aguas termales en el cuerpo humano:

El baño en aguas termales tiene un efecto terapéutico aumenta la temperatura del cuerpo, matando gérmenes, entre ellos virus, además aumenta la presión hidrostática del cuerpo, por lo que aumenta la circulación sanguínea y la oxigenación. Esta elevación en la temperatura ayuda a disolver y eliminar las toxinas del cuerpo. Al aumentar la oxigenación, el baño en aguas termales hace que mejore la alimentación de los tejidos del cuerpo en general, motivo por el cual aumenta el metabolismo, estimulando al mismo tiempo las secreciones del tracto digestivo y del hígado, ayudando así a la digestión. (Muñoz, 2018)

El baño repetido (especialmente en periodos de 3 a 4 semanas) puede ayudar a normalizar las funciones de las glándulas endocrinas, así como el funcionamiento en general del sistema nervioso autónomo del cuerpo. También existe un mejoramiento y estímulo del sistema inmune, relajación mental, producción de endorfinas y regulación de las funciones glandulares. Muchos de estos efectos se deben al consumo de minerales como dióxido de carbono, azufre, calcio y magnesio. (Muñoz, 2018)

Hay enfermedades de la piel que pueden tener una marcada mejoría por baños en aguas termales (en especial si estas contienen azufre). Las enfermedades más tratadas son la psoriasis, las dermatitis y las enfermedades por hongos. También ayudan en la cura de heridas y de otras lesiones de la piel. En ocasiones esta acción se le atribuye a las “sulfobacterias” este grupo de

microorganismos ayudan al cuerpo humano mejorando el sistema de defensa de la piel frente a todo tipo de agresiones. De la misma forma, ayudan a disminuir el proceso de envejecimiento de la piel. (Muñoz, 2018)

1.7 Características Microbiológicas de las Aguas Termales

1.7.1 Microbiología.

La microbiología es la parte de la biología que estudia a los microorganismos, su forma, estructura, fisiología, reproducción, teniendo por objetivo conocer las actividades beneficiosas y perjudiciales de estos organismos. En el campo de la salud esta ciencia se centra en el estudio de los microorganismos dañinos para la salud, es decir estudia las relaciones entre las funciones microbianas y las enfermedades que producen estos microorganismos en los seres humanos. (Altaga, 1998)

1.7.2. Clases de microorganismos patógenos en Aguas.

Algunos microorganismos se han desarrollado en ambientes acuáticos: dulces, naturales, salados, estuarios y termales como: virus, bacterias, algas, protozoos, hongos microscópicos. Las bacterias pueden ser Autóctonas si son propios del ambiente acuífero natural, o Alóctonas si llegaron a este ambiente acuífero procedentes de uno diferente al ser transportados por agentes como: aire, animales, humanos. (Altaga, 1998)

En las aguas termales se pueden encontrar algas, protozoos y bacterias. Entre éstas últimas se encuentran: las ferrobacterias, organismos autótrofos que se hallan en las aguas ferruginosas y precisan del hierro para cubrir sus exigencias vitales; las mangesobacterias, que precisan el manganeso para vivir; sulfobacterias, que intervienen en el ciclo del azufre; y bacterias halófilas, que resisten altas concentraciones de sal. Estos microorganismos constituyen la flora normal de este tipo de agua, y por tanto, el hallazgo de otras bacterias impropias de esta localización y que además son patógenas para el hombre, supone una contaminación exógena del agua que la convierte en no potable. (Altaga, 1998)

La fuente de agua termal es de utilidad pública y como tal debe cumplir las condiciones de potabilidad de agua. En la Legislación Española (BOE número 226 del 20 de Septiembre de 1990, relativa a la reglamentación técnico sanitaria para el abastecimiento y control de calidad de las aguas potables de consumo público) se diferencia entre análisis normales, mínimos, completos,

ocasionales e iniciales, estableciéndose las condiciones y frecuencia en que deberán ser realizados. Los análisis completos, incluyen la determinación de coliformes totales, coliformes fecales, *Enterococcus*, *Clostridium* sulfito-reductores, patógenos humanos y bacterias aerobias a 37° y 22°C. (Altaga, 1998)

Los manantiales termales poseen una gran diversidad microbiana aunque no es específica de cada uno de ellos. Sin embargo, se observa una cierta relación entre algunos microorganismos y las aguas con características fisicoquímicas extremas de pH, temperatura, salinidad y radiactividad. Los manantiales con pH alcalino tienen poca diversidad microbiana, encontrándose *Pseudomonas*, *Bacillus* que pueden vivir a estos pH y los de pH ácido presentan un número de bacterias muy pequeño, principalmente bacilos Gram positivos irregulares. En los manantiales hipertermales predominan las bacterias Gram positivas y en los hipertónicos, con alto contenido en cloruro sódico, abundan los microorganismos halófilos moderados. (Altaga, 1998)

1.7.3 Observación de las colonias bacterianas

1.7.3.1 Crecimiento en medio sólido

Cuando existe un crecimiento bacteriano en la superficie de un medio sólido los organismos permanecen fijos formando masas de millones de células que pueden ser observadas a simple vista, masas que se denominan colonias bacterianas y cuyo tamaño puede ser diminuto apenas visible hasta masas de muchos milímetros. (De la Rosa, 2000)

El tamaño, forma, color, textura y olor son importantes para la identificación bacteriana, esto tomando en cuenta que estas características dependen de la naturaleza del medio de cultivo y las condiciones de incubación, las mismas que pueden ser controladas para proporcionar un valor diferencial a la identificación. (De la Rosa, 2000)

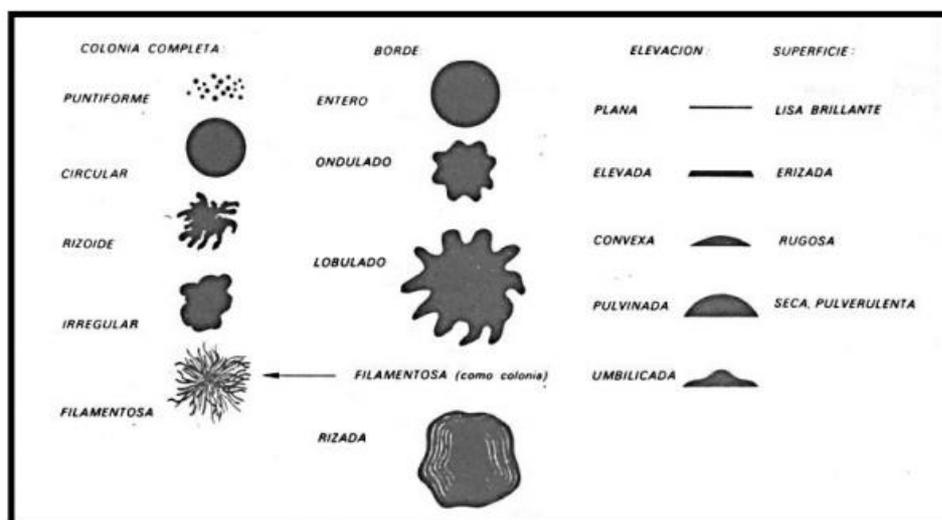


Figura 1-1: Características de bacterias en medio sólido
Realizado por: Stanchi N. O. et al., 2007

Tamaño: varía según el tipo de bacteria, aunque normalmente pueden observarse a simple vista, por ejemplo: las colonias de *Streptococcus* son relativamente pequeñas, mientras que las de *Staphylococcus* o bacilos pueden alcanzar hasta 1cm de ancho.

Morfología: normalmente viene dada por su borde y las forma de elevarse en el medio de cultivo, pudiendo ser liso o irregular.

Superficie: si la examinamos sobre luz reflejada la superficie puede tener un aspecto liso brillante a la luz, o rugoso sin brillo.

Cuando existe un crecimiento bacteriano en tubos con medios sólidos o semisólidos, lo que se observa es el enturbiamiento o cambio de color debido a las características tanto del medio como de la cepa bacteriana aislada. (Apella et al., Araujo et al., 2015)

1.7.3.2 Crecimiento en medio líquido

Los aspectos a considerar en este caso son la cantidad de crecimiento, en la superficie, la turbidez, y el aspecto del depósito en el fondo del tubo. (Apella et al., Araujo et al., 2015)

1.7.3.3 Métodos de Identificación de Carga Microbiana en Agua

Los métodos utilizados para la identificación de carga microbiana permiten cultivar, identificar y cuantificar, donde deben cumplir un esquema para la identificación de una cepa bacteriana desde el punto de vista bioquímico:

A partir de un cultivo puro, describir la morfología celular, incluye forma, tamaño, color y distribución de la colonia frente a otras.

Examen microscópico del microorganismo por coloración Gram, para determinar la forma y la coloración.

Movilidad, inoculando al microorganismo en medios semisólidos.

Ejecución de pruebas primarias (catalasa, oxidasa, OF) estas pruebas nos ayudan a determinar la especie, grupo de género, o alguna familia a la que pertenece el aislado.

Características bioquímicas, son la base de los procesos de identificación por la presencia de algunas enzimas determinadas por sustratos cromogénicos, por la formación de diferentes productos finales, formación de ácido a partir de algunos hidratos de carbono.

Lo antes mencionado lo encontramos en: (López et al., Tévez et al., Torres et al.; 2010).

1.8 Características Organolépticas

1.8.1 Color.

El color de las aguas se debe a las diferentes sustancias coloreadas existentes en suspensión o disueltas en ellas. En aguas naturales el color proviene de las numerosas materias orgánicas: procedentes de la descomposición de vegetales, de metabolitos orgánicos (coloraciones amarillentas), presencia de sales solubles como Fe y Mn (aguas subterráneas y superficiales poco oxigenadas) también producen coloración al agua.

1.8.2 Olor y Sabor.

El sabor y olor de las fuentes de agua responden a dos orígenes: naturales y artificiales. El olor incluye presencia de gases, sales, compuestos orgánicos y artificiales. Los compuestos orgánicos

que potencialmente definen el olor y sabor del agua, son prácticamente todos los que pueden vivir en ella, es decir, algas, hongos, bacterias, los encargados de llevar a cabo la putrefacción de materias orgánicas y su descomposición.

1.9 Caracteres Físicoquímicos de las Aguas Termales

Se identifican los parámetros físicos y químicos característicos que describan las propiedades básicas de la fuente termal.

1.9.1 Turbiedad.

Se define como la capacidad que presenta el material suspendido en el agua para obstaculizar la entrada de la luz. La unidad de medida es en mg/L. La turbidez se trata por medio de métodos de coagulación, sedimentación y filtración. (Barrenechea, 2004)

1.9.2 Temperatura.

La temperatura del agua se establece por la absorción de radiación en las capas superiores del líquido, donde la variación de temperatura afecta a la solubilidad de sales y gases en agua, en general a todas sus propiedades, tanto químicas como su comportamiento microbiológico. La temperatura de las aguas subterráneas depende del terreno que drenan, naturaleza de las rocas, profundidad de la surgencia y fenómenos magmáticos. (Barrenechea, A, 2004)

1.9.3 Sólidos Totales.

Es todo material que permanece después de que se evapora el agua, los sólidos totales se clasifican en sólidos suspendidos y en sólidos disueltos. En el agua la mayor parte de sólidos se encuentran disueltos, y estos corresponden especialmente. (Barrenechea, A, 2004)

1.9.4 pH.

El pH de un agua se debe sobre todo al equilibrio carbónico y a la actividad vital de los microorganismos acuáticos.. Por otro lado, el aporte de ácidos que naturalmente pueden acceder a un medio hídrico lo podría acidificar (así, por ejemplo, el H₂S formado en aguas poco oxigenadas y con fuerte ambiente reductor o los ácidos húmicos provenientes de la mineralización de la materia orgánica). Efectos de alcalinización natural de un agua pueden detectarse vía

disolución de rocas y minerales de metales alcalinos y alcalinotérreos del terreno drenado por un agua. El pH de aguas superficiales se encuentra en el intervalo de 6 a 8.5, pudiendo las aguas subterráneas presentar menores valores de pH que las superficiales. (Barrenechea, A, 2004)

1.9.5 Calcio.

Es la razón más habitual de la dureza y afecta fundamentalmente a las propiedades incrustantes y corrosivas de un agua. Las concentraciones de Ca en aguas varían mucho, estando asociadas al nivel de mineralización; por esto mismo, las aguas subterráneas presentan comúnmente más altos contenidos que las superficiales. La presencia de Ca en agua potable la dota de "sabor" que dependerá del anión mayoritario presente. (Barrenechea, A, 2004)

1.9.6 Cloruros.

La concentración de Cl⁻ en aguas de superficie se sitúa alrededor de 20-40 mg/l e incluso menores. En ríos, es típico su incremento a lo largo del recorrido del cauce fluvial desde su nacimiento hasta su desembocadura. En aguas subterráneas, las concentraciones pueden variar extraordinariamente en función de afluentes de agua marina en determinados acuíferos (el agua salada tiene hasta 19 g/l del ion): sin embargo, también pueden medirse contenidos tan bajos como 5 mg/l. (Barrenechea, A, 2004)

1.9.7 Magnesio.

El contenido de dureza está relacionado con el contenido de magnesio, además de la formación de incrustaciones y propiedades corrosivas del agua. Elemento frecuente bajo forma de carbonatos, sulfatos y cloruros, así como en silicatos. Sus concentraciones medias en aguas no marinas se sitúan alrededor de 20-40 mg/l (segundo catión mayoritario tras el Ca). En ríos, la concentración del metal suele aumentar desde el nacimiento hasta la desembocadura por disolución de rocas y minerales del terreno. (Barrenechea, A, 2004)

1.9.8 Sulfatos.

Los sulfatos, sales solubles en agua a excepción de los de Pb, Ba y Sr, se hallan profusamente repartidos en todas las aguas. El ion procede fundamentalmente de los procesos de disolución de yesos (CaSO₄·2H₂O), sin olvidar las cantidades procedentes de la oxidación bacteriana de

sulfuros. El efecto desfavorable que producen altos contenidos de sulfatos (tanto cálcicos como magnésicos), generando la sal de CANDLOT-MICHAELIS conocida como "cáncer del cemento" y que destruye irremisiblemente el hormigón y tuberías. Como efecto positivo, ha de destacarse que aguas con importante contenido en sulfatos, insolubilizan los metales pesados allí presentes y minimizan su toxicidad. (Barrenechea, A, 2004)

1.9.9 Nitritos y Nitratos.

Son especies derivadas del Nitrógeno su concentración se asocia con la posterior aparición de algas. La presencia de Nitratos en aguas procede de la disolución de rocas y minerales (muy frecuentes), de la descomposición de materias vegetales y animales. En general, las aguas naturales de superficie no suelen contener más de 10 mg/l e incluso con frecuencia no pasan de 1 mg/l de la sustancia. (Barrenechea, A, 2004)

1.9.10 Hierro.

Las aguas que presentan niveles altos de este metal, al entrar en contacto con el aire se precipitan ocasionando sólidos sedimentables, y una posible coloración de las aguas. Elemento muy frecuente, en forma ferrosa Fe^{2+} y férrica Fe^{3+} siendo la solubilidad en agua de sal ferrosa mayor que la de la férrica. (Barrenechea, A, 2004)

1.10 Técnicas de Análisis Microbiológico Placas Petrifilm

Las placas Petrifilm son soportes reconocidos por la Asociación Oficial de Química Analítica Internacional, consiste en medios de cultivos listos para realizar la siembra bacteriana, están compuestos por un film superior plástico recubierto de un adhesivo, indicador y gel soluble en frío; y un film inferior de papel recubierto de plástico con cuadrícula impresa, adhesivo del cultivo estándar y gel soluble en frío, lo que permite llevar a cabo la siembra de forma rápida y reproducible. (3M, Petrifilm. 2014. p.3)

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

1. Siembra: fácil sin necesidad de preparación de medio, solo se levanta el film y se añade la muestra.
2. Incubación: ocupan muy poco espacio en la estufa debido a su diseño.

3. Interpretación: por los pigmentos indicadores incorporados el recuento se realiza de manera sencilla y en pocos minutos. (3M Petrifilm. 2014. p.3)

Beneficios:

Mejora las condiciones de trabajo para los analistas, aumentando la productividad y organización en el trabajo, con garantía en cada proceso

El tamaño compacto de la placa reduce mucho espacio en el laboratorio y reduce los residuos.

El proceso de fabricación de estas placas es garantizado debido a que posee la Certificación ISO 9000 para desarrollo producción y comercialización, por lo que además están en conformidad con los requerimientos para medios de cultivo. (3M Petrifilm. 2014. p.3)

1.11 Tinción Gram

Es una técnica de laboratorio que permite clasificar a las bacterias de acuerdo a la estructura de la pared bacteriana en dos grupos: Gram Positivas y Gram Negativas, basado en si luego de la decoloración retienen o no el colorante cristal violeta. Las bacterias que retienen el colorante aparecen como azules oscuros o violetas y corresponden a las bacterias Gram Positivas; mientras que las que pierden el colorante cristal violeta y se tiñen con safranina se visualizan de color rosado o fucsia perteneciente a bacterias Gram Negativas. (Arcos, Mireya, 2004)

1.11.1 Bacterias Gram negativas

En este grupo se puede aislar en el agua, las bacterias Gram (-) como: *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Gallionella*, *Enterobacteriaceae*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Bordetella*, *Neisseria*, *Moraxella* y *Acinetobacter*. (Arcos, Mireya, 2004)

Las *Pseudomonas* son las más comunes, debido a sus bajos requerimientos nutricionales y a su versatilidad frente a las fuentes de carbono. Estas bacterias son bacilos, es decir se desarrollan en un rango de temperatura entre 15° y 50° C, son organismos flagelados, producen pigmentos verdes, azules, verdosos, rojos o marrones y no forman esporas, a diferencia de las *Enterobacterias* no fermentan azúcares. De este grupo la *Pseudomonas aeruginosa*, un patógeno oportunista, causante de infecciones en vías urinarias, intestinos y oídos. Su presencia es habitual en tanques o sistemas de almacenamiento por lo que su control debe ser asiduo, más aun cuando existe déficit de cloración. (Apella et al., Araujo et al., 2015)

Las *Enterobacteriaceae* las más importantes entre los organismos anaeróbicos facultativos, y su presencia está íntimamente ligada a contaminación fecal, puesto que su hábitat esta en los intestinos de los animales. Se trata de bacilos no esporulados, inmóviles en su mayoría y con requerimientos nutricionales muy simples. Se identifican fácilmente por su capacidad de fermentar glucosa por vía glucolítica dando como producto final ácidos. *Escherichia coli*, normalmente localizada en los intestinos humanos, es usada como indicador de contaminación fecal en aguas. Otros microorganismos patógenos que forman parte de este grupo son *Shigella* (*Shigella dysenteriae* causante de disentería), *Salmonella* (*Salmonella typhi* causante de tifoidea) y *Klebsiella*. (Arcos, Mireya, 2004)

1.11.2 Bacterias Gram positivas

Los más representativos son los géneros *Micrococcus*, *Staphylococcus* y *Streptococcus*, de los cuales los dos primeros corresponden a bacterias aerobias muy tolerantes a grandes concentraciones salinas, característica que los diferencia de los *Streptococcus*, que incluyen al *Enterococcus faecalis*, patógeno humano que habita comúnmente en el intestino del hombre y por ello es considerado indicador de contaminación fecal. (Apella et al., Araujo et al., 2015)

Tanto el género *Bacillus* como el *Clostridium*, corresponden a bacterias esporulantes de metabolismo aeróbico y anaeróbico respectivamente. Los *Bacillus* normalmente son aislados a partir de suelos acuáticos aeróbicos, de ellos el *Bacillus anthracis* interviene en el desarrollo del ántrax; mientras que los *Clostridium* se aíslan a partir de suelos, aguas subterráneas anaeróbicas y del tracto intestinal de animales, de ellos el *Clostridium tetani* ocasiona el tétano. (Arcos, Mireya, 2004)

1.12 Pruebas Bioquímicas

Las pruebas bioquímicas consisten en distintos test químicos aplicados a medios biológicos, los cuales permiten identificar microorganismos. Se basan en determinar la actividad de una vía metabólica a partir de un sustrato que se incorpora en un medio de cultivo y que la bacteria al crecer puede utilizar o no. (Cercenado y Cantón, 2010: p.8)

1.12.1 Prueba de la Catalasa.

Esta prueba evidencia la presencia de la enzima catalasa en las bacterias, la cual hace posible que el peróxido de hidrogeno se descomponga en agua y oxígeno el cual se libera y produce burbujas. (Cercenado y Cantón, 2010: p.8)

1.12.2 Prueba de la Oxidasa.

Determina la presencia de enzimas oxidantes. La reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromo-oxidasa que activa la oxidación del citocromo el cual es reducido por el oxígeno molecular produciendo agua o peróxido de hidrógeno. (Cercenado y Cantón, 2010: p.15)

1.12.3 Citrato.

Esta prueba determina la capacidad que poseen algunos microorganismos de crecer con citrato como única fuente de carbono y sales amoniacales inorgánicas siendo única fuente de nitrógeno que provoca la alcalización del medio que producirá un cambio de color de verde a azul. (Cercenado y Cantón, 2010: p.16)

1.12.4 Reacción de la Ureasa.

Determina la capacidad de los microorganismos para hidrolizar la urea en dos moléculas de amoníaco por acción de la enzima ureasa. Estos productos metabólicos alcalinizan el medio, provocando el viraje del indicador rojo fenol del amarillo al rojo. (Cercenado y Cantón, 2010: p.21)

1.12.5 Kligler Hierro Agar.

Esta prueba es utilizada en la identificación de enterobacterias en base a la fermentación de lactosa y glucosa, además de la formación de ácido sulfhídrico. Contiene nutrientes como peptona de carne y tripteína que colaboran en el desarrollo de las bacterias, contiene lactosa y glucosa. La fermentación de azúcares acidifica el medio la que es evidenciada por el cambio de color rojo de fenol a amarillo que es el indicador ácido base incorporada y si no hay fermentación el medio vira a rojo. (Cercenado y Cantón, 2010: p.25)

1.12.6 SIM o Sulfhídrico Indol Movilidad.

El SIM es un medio de cultivo semisólido, se emplea para detectar la presencia de la enzima triptofanasa en bacterias, la cual degrada el aminoácido triptófano a indol. Al añadir el reactivo de Erlich produce un compuesto de coloración roja. Es un medio destinado a verificar la producción de indol, sulfuro de hidrógeno y movilidad en un mismo. (Cercenado y Cantón, 2010: p.25)

1.13 Pruebas de Identificación de Microorganismos

1.13.1 O.F. de Hugh & Leifson.

Esta prueba indica el tipo de metabolismo oxidativo o fermentativo que presentan las bacterias. Para detectar si las bacterias utilizan los carbohidratos por la vía oxidativa o fermentativa se utiliza el agar OF, que contiene agar, peptona y azul de bromotimol como indicador de pH. Inicialmente el medio es de color verde y vira a amarillo cuando el medio se acidifica producto de la fermentación u oxidación del carbohidrato. (Cercenado y Cantón, 2010: p.19)

1.14 Prueba de Resistencia Bacteriana a Antibióticos (Antibiograma)

Un antibiograma permite determinar la sensibilidad y resistencia de una bacteria expuesta a la acción farmacológica de un antibiótico siendo estos resultados cualitativos, o cuantitativos determinando así la concentración mínima inhibitoria (CMI) del antibiótico. (Cercenado y Cantón, 2010: p.45)

El método de difusión en disco, es la prueba de sensibilidad o resistencia de los microorganismos, expuestos al fármaco impregnado en pequeños discos. (Cercenado y Cantón, 2010: p.45)

1.14.1 Resistencia antimicrobiana

La resistencia a los antimicrobianos se refiere la capacidad que poseen los microorganismos (hongos, virus, bacterias, parásitos) para resistir los efectos tóxicos de un antibiótico, los microorganismos sufren cambios que hace 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)

Sensible: El microorganismo presenta una gran área de inhibición por el fármaco con el 95% de éxito. El fármaco inhibe al microorganismo patógeno; puede ser una elección apropiada para el tratamiento. (Cercenado y Cantón, 2010: p.45)

Resistente: Presenta muy poco o casi nada de halo de inhibición .El fármaco no posee efecto inhibitorio sobre el microorganismo; por lo que no es un fármaco de elección para el tratamiento. No es de esperar ningún efecto terapéutico sea cual fuere el tipo de tratamiento. (Cercenado y Cantón, 2010: p.45)

CAPÍTULO II

2. METODOLOGÍA

2.1 Ubicación

Las aguas termales Ojo de Fantasma están ubicadas en la Comunidad Pungal de la Parroquia Puela del cantón Penipe de la provincia de Chimborazo. Su origen es volcánico, la fuente subterránea desemboca en las faldas del volcán Tungurahua.



Figura 1-2: Ubicación del Manantial
Realizado por: Penipe Catalogo Turístico, 2012





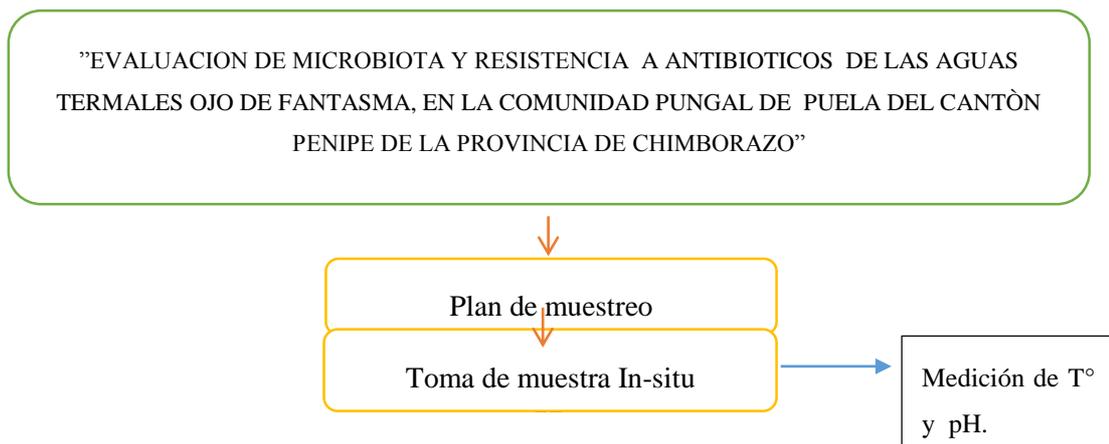
Figura 2-2: Ubicación de las Fuentes
Realizado por: Erica Guamán, 2018

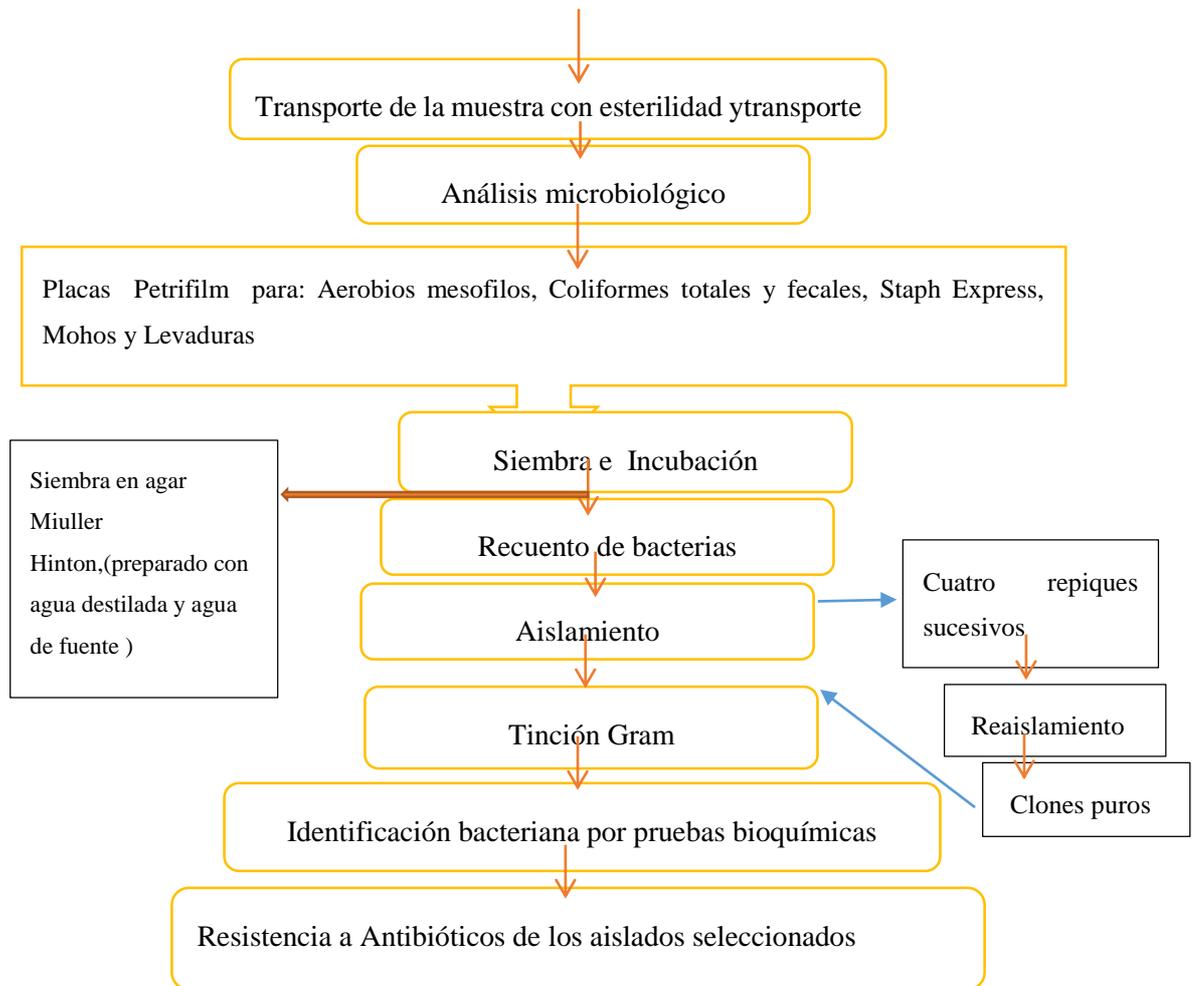
2.2 Metodología de la investigación:

La investigación es de tipo exploratorio, descriptivo y no experimental, ya que nuestro objetivo es el Evaluación de la Microbiota y la Resistencia a Antibióticos de las Aguas Termales Ojo de Fantasma, siendo el inicio de nuevos estudios para una activación turística y responsable de la comunidad.

2.3 Tipo y Diseño de la Investigación:

- Por el tiempo de concurrencia de los hechos: Prospectiva
- Por el tipo de datos y de análisis: Cuantitativo
- Por el tipo de alcance: descriptivo y exploratorio
- Por la secuencia del estudio: transversal
- Por el tiempo: a medio plazo
- Por el lugar: investigación de laboratorio y de campo
- Por la utilización de conocimientos: aplicativo
- Por el proceso formal: hipotético- deductivo





2.4 Unidad de Análisis

En el presente trabajo de investigación se realizó la Evaluación de la Microbiota y la Resistencia a Antibióticos de las Aguas Termales Ojo de Fantasma, con el estudio de la presencia de bacterias mesofilas, coliformes totales y fecales, *Staphylococcus aureus*, mohos y levaduras, las cuales podrían causar daño en la salud de los usuarios.

2.5 Población de Estudio

Población

El grupo poblacional para el desarrollo del estudio será las piscinas naturales de las aguas termales Ojo de Fantasma, en la comunidad Pungal de Puela del cantón Penipe de la provincia de Chimborazo.

Toma de muestra

El muestreo en las aguas termales Ojo de Fantasma se inició con la muestra del agua en el ojo de fuente de las piscinas naturales. La muestra se tomó por duplicado.

Tabla 1-2: Toma de muestra de las Piscinas Naturales

Codificación de las muestras	M1	M2	M3
Ubicación	Piscina situada antes del Río y junto a la piscina M2.	Piscina localizada antes del Río, piscina rustica creada en el lugar de surgencia del agua subterránea.	Piscina junto al río
Descripción	M2a, M2b, M1a, M1b corresponden a la toma de muestra.		Estas muestras tienen una codificación de M3A y M3B en agares preparados con agua de fuente. M3a, M3b con agua destilada.

Realizado por: Erica Guaman, 2018

Ubicación del lugar de Análisis e Investigación

Provincia: Chimborazo

Cantón: Riobamba

Laboratorio de Análisis bioquímicos y bacteriológicos de la Facultad de Ciencias- ESPOCH.

2.6 Materiales, Equipos, Reactivos

Los materiales, equipos y reactivos utilizados para el presente trabajo de investigación fueron:

Tabla 2-1: Materiales de Laboratorio.

Cooler
Reverbero
Mascarilla
Mechero
Mandil
Guantes
Tiras indicadoras de pH
Pipetas 100 y 1000ul
Erlenmeyer de 100 y 250 mL
Palillos de madera
Envases de plástico estéril 120mL

Caja Petri
Probeta de 100mL
Puntas Amarillas y Azules
Asa de platino
Gradillas
Tubos de ensayo
Placa porta y cubre objetos
Algodón
Vaselina
Alcohol
Discos de Sensibilidad
Marcador indeleble
Pinza punta plana

Realizado por: Erica Guaman, 2018

Tabla 2.6.2 Equipos de Laboratorio.

Cámara de flujo laminar
Estufa bacteriológica
Autoclave
Microscopio

Realizado por: Erica Guaman, 2018

Tabla 2.6.3 Reactivos

Agua Destilada
Agua de Fuente
Agua Oxigenada
Cristal Violeta
Lugol
Alcohol
Cetona
Safranina

Realizado por: Erica Guaman, 2018

2.7 Métodos y Técnicas

2.7.1 Muestreo

Recolección de la muestra de aguas

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. Las muestras se trasladaron en un cooler temperatura ambiente hasta el laboratorio. (NTE INEN 2169:1998)(NTE INEN 2176)

Identificación y Conservación de las Muestras

Las muestras fueron identificadas luego de la recolección evitando de este modo posible contaminación.

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 2176:2013).

Para la conservación de la muestra se utilizó coolers con bolsas de agua termal, las mismas que se trasladan al laboratorio de la Facultad de Ciencias, para realizar el análisis microbiológico antes de las 48 horas, según la NTE INEN 2169:2013

Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Las técnicas e instrumentos utilizados para el análisis microbiológico de las aguas termales de Ojo de Fantasma 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.

2.7.2 Pruebas Físico- Químicas (Temperatura, pH).

Estas pruebas se realizaron, es decir en las piscinas naturales de aguas termales y con la debida asepsia.

El análisis se realizó, 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

2.7.3 Transporte de las muestras

Las muestras recolectadas en las aguas termales fueron transportadas desde el Pungal 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.

2.8 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.

2.8.1 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.

2.8.1.1 Siembra en las placas 3M Petrifilm

En la cámara de flujo laminar y con el mechero encendido de 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)

2.8.1.2 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)

2.8.1.3 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 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 ESPAÑA S.A., 2002)

2.8.2 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)



Figura 3-2: Siembra en las placas 3M Petrifilm
Realizado por: Erica Guamán, 2018

2.8.3 Estabilización de los aislados bacterianos

2.8.3.1 Aislamiento de las colonias de microorganismos

Se escogieron algunas colonias de cada placa Petrifilm sembrada (aerobios, *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 asacar 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 inoculo 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 realizo por al menos cuatro veces más hasta obtener colonias estables.

2.8.3.2 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, 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 re aislar.

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 4-2: Agar Mueller Hinton
Realizado por: Erica Guamán, 2018

2.8.4 Descripción macroscópica de los aislados bacterianos

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

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

2.9 Tinción Gram de las colonias puras Aisladas.

Se realizó la tinción Gram para observar si los clones aislados, 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 el clon obtenido del aislamiento,

Se extiende la muestra sobre la placa y posteriormente se fijó la muestra a la placa con la ayuda del calor de un mechero.

Una vez fijada la muestra se procede a utilizar sobre ella los cuatro reactivos para la tinción de Gram: cristal violeta, lugol, alcohol- cetona y safranina durante un minuto a excepción del alcohol-cetona (30 segundos).

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.

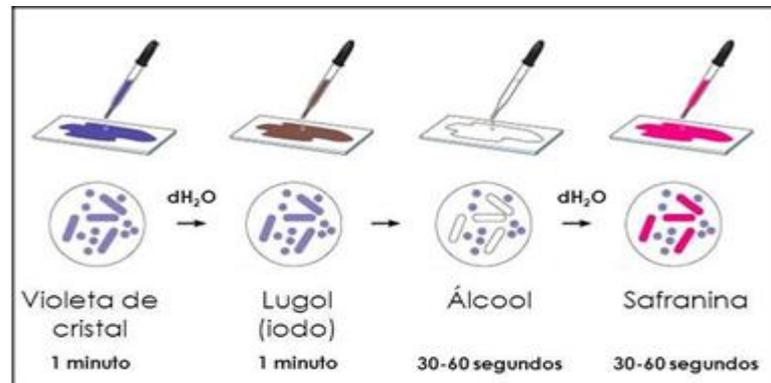


Figura 5-2: Coloración Gram.

Realizado por: Erica Guaman, 2018

2.10 Pruebas Bioquímicas

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



Figura 6-2: Pruebas Bioquímicas

Realizado por: Erica Guaman, 2018

2.10.1 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.

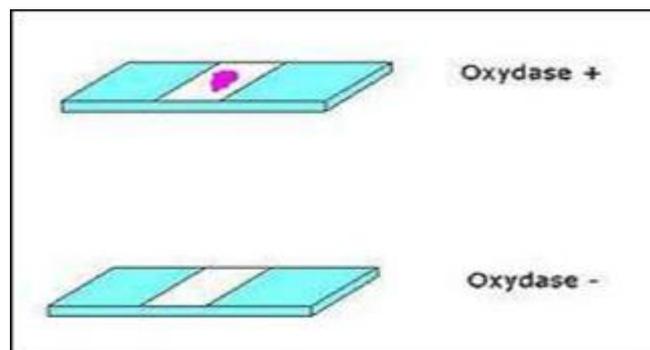


Figura 7-2: Prueba de Oxidasa
Realizado por: Erica Guaman, 2018

2.10.2 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). (Benavides, 2017)

Interpretación de los resultados.

La formación inmediata de burbujas es considerada prueba positiva, si no existe la formación es negativa. (Benavides, 2017)

Catalasa (+): *Staphylococcus aureus*, la familia *Micrococcaceae*

Catalasa (-): *Streptococcus spp* y *Enterococcus spp*.



Figura 8-2: Prueba de la Catalasa
Realizado por: Erica Guaman, 2018

2.10.3 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.

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. (Guaylla, et al., 2015, p. 75)

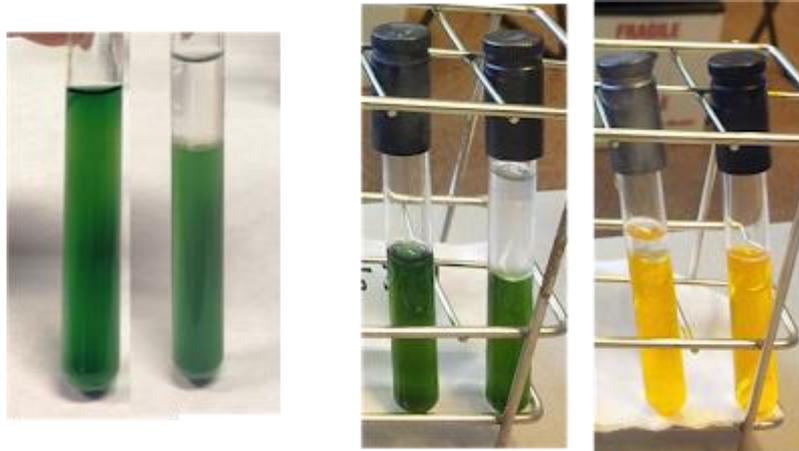


Figura 9-2: Prueba de óxido-fermentación es Hugh-Leifson, O-F
Realizado por: Erica Guaman, 2018

2.11 Identificación de cocos Gram positivos

2.11.1 Fermentación y crecimiento en agar Manitol Salado

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. (Guaylla,2015)

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)

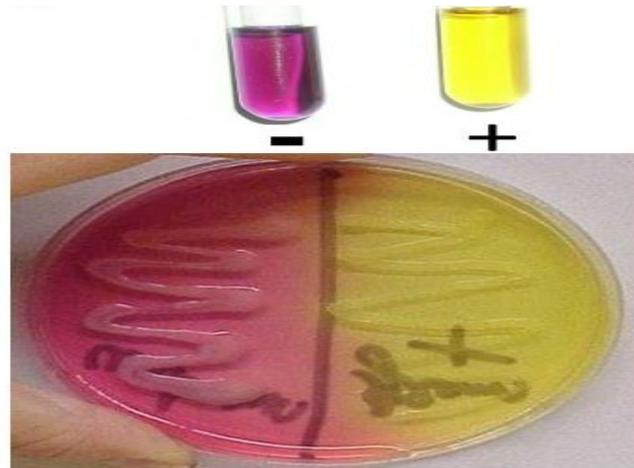


Figura 10-2: Fermentación y crecimiento en agar Manitol Salado
Realizado por: Erica Guaman, 2018

2.12 Identificación de Bacilos Gram Negativos

2.12.1 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 incubó 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)

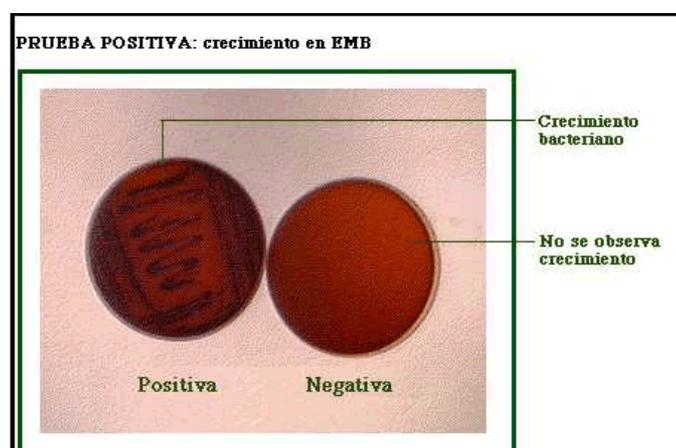


Figura 11-2: Crecimiento en agar Eosina Azul de Metileno
Realizado por: Erica Guaman, 2018

2.12.2 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 incubó 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)

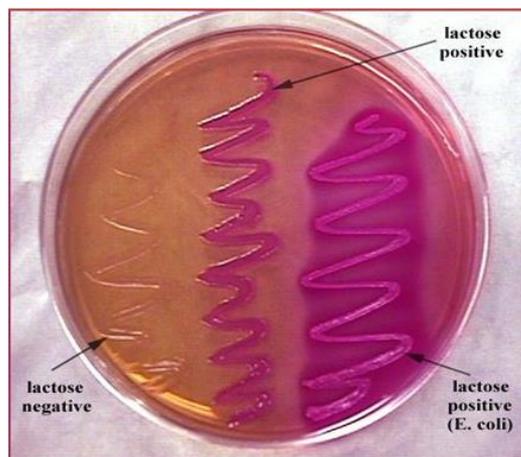


Figura 12-2: Crecimiento en agar MacConkey
Realizado por: Erica Guaman, 2018

2.12.3 Prueba en agar Kligler

Con la asa 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 asa 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)

Tabla 3-2: 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
Gas en la fermentación de la glucosa	Burbujas o despegamiento del medio

Fuente: Procedimientos diagnósticos, 2008

2.12.4 Prueba del citrato

Se tomó un clon bacteriano con un asa 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)

2.12.5 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 continuo de color verde la prueba del citrato es negativa.

2.12.6 Prueba de la urea

Con un asa estéril se tomó un clon bacteriano del agar Mueller Hinton.

Se sembró en forma de 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)

2.12.7 Medio SIM

Con un asa 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,

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)

2.13 Antibiograma

Para la realización de esta prueba se utilizó el método de difusión de agar de acuerdo al siguiente protocolo:

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 toquitos 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 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)

2.14 Identificación bacteriana

Al realizar todas las pruebas mencionadas se comparan los resultados con lo presentado en la bibliografía permitiéndonos clasificar a las bacterias en familia, género, especie, tipo y cepa, permitiendo diferenciar si el microorganismo es patógeno y deducir los posibles mecanismos de resistencia del microorganismo. (Álvarez, E.BOQUET 2013)

Si posterior a la revisión de resultados y tablas de comparación, se encontraron coincidencias con las bacterias descritas, se reportan los nombres de los microorganismos. De lo contrario para obtener un resultado se acude a sistemas de pruebas bioquímicas estandarizadas. (Álvarez, E.BOQUET 2013)

Tabla 4-2: Resultados de las pruebas bioquímicas para la Identificación Bacteriana

	Kligler											
	Glucosa	Gas/glucosa	Lactosa	SH ²	citrato	Fenilalanina desaminasa	indol	Lisina descarboxilasa	manitol	movilidad	ureasa	
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	-	-	-	+	+	+	V ₊	-	
<i>Escherichia coli inactiva</i>	+	-	V-	-	-	-	+	V	+	-	-	
<i>Shigella dysenterise</i>	+	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	
<i>Shigella flexneri</i>	+	-	-	-	-	-	V	-	+	-	-	
<i>Shigella boydil</i>	+	-	-	-	-	-	V-	-	+	-	-	
<i>Shigella sonnei</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
<i>Klebsiella pneumonise</i>	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	
<i>Klebsiella ozaenae(1)</i>	+	V	V-	-	V-	-	-	V	+	-	V-	
<i>Klebsiella thinoscleromatis(1)</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	
<i>Enterobacter cloacae</i>	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	V ₊	
<i>Enterobacter aerogenes</i>	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	
<i>Enterobacter agglomerans</i>	+	V-	V	-	V	V-	V-	-	+	V ₊	V-	
<i>Enterobacter gergoviae</i>	+	+	V	-	+	-	-	+	+	+	+	
<i>Enterobacter sakasakil</i>	+	+	+	-	+	V	V-	-	+	+	-	
<i>Serratia marcescens</i>	+	V	-	-	+	-	-	+	+	+	V-	
<i>Serratia liquefaciens</i>	+	V	V-	-	+	-	-	V ₊	+	+	-	
<i>Serratia rubidaea</i>	+	V	+	-	+	-	-	V	+	V ₊	-	
<i>Morganella morganii</i>	+	V ₊	-	-	-	+	+	-	-	+	+	
<i>Proteus mirabilis</i>	+	V ₊	-	+	V ₊	+	-	-	-	+	+	
<i>Proteus vulgaris</i>	+	V ₊	-	+	V-	+	+	-	-	+	+	
<i>Providencia alcalifaciens</i>	+	V ₊	-	-	+	+	+	-	-	+	-	
<i>Providencia rettgeri</i>	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	
<i>Providencia stuartil</i>	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	V ₊	

Fuente: Alvarez et al., Boquet et al.; 1990;p.74

Realizado por: Erica Guamán, 2018

CAPÍTULO III

3.- DISCUSION DE RESULTADOS OBTENIDOS EN LA INVESTIGACION

3.1.- Determinación IN SITU de Parámetros: Temperatura y pH

Tabla 1-3: Valores obtenidos para la temperatura y pH en los sitios de muestreo

PARAMETROS	VALORES			
		M1	M2	M3
Temperatura (°C)	T1	40	38	44
	T2	38	38	44
Ph	pH1	7	7	7
	pH2	7	7	7
Temperatura Ambiente (°C)	22			

Realizado por: Erica Guamán, 2018

Se describen en la Tabla 3.1 los valores obtenidos para los parámetros físicos temperatura y pH en las aguas termales. La temperatura ambiente fue de 22 °C, mientras el promedio de la temperatura de la toma de las piscinas naturales es de 40°C exponiendo así la diferencia de 18 °C superior que la temperatura ambiente del lugar, relacionamos así este resultado con los estudios realizados por Burbano (BURBANO, et al. 2013) que manifiesta que la temperatura de una fuente para considerarla como manantial termal debe estar superior a 4 o 5 °C del promedio de la temperatura del lugar de su ubicación.

EL pH del agua puede tener interferencia en procesos químicos y biológicos, el pH fue medido al momento de la toma de las muestras. El pH condiciona la supervivencia y el crecimiento bacteriano, cada microorganismo tiene un rango de pH óptimo para vivir. (Escudero, 2012)

En un estudio realizado en Baños de Jaraba por Aragón Torija y colaboradores(2004, pp.502-503) determinaron en las muestras de agua termal un pH cercano a 6.5 en este estudio el valor de pH promedio fue de 7.

3.2 ANALISIS MICROBIOLOGICO

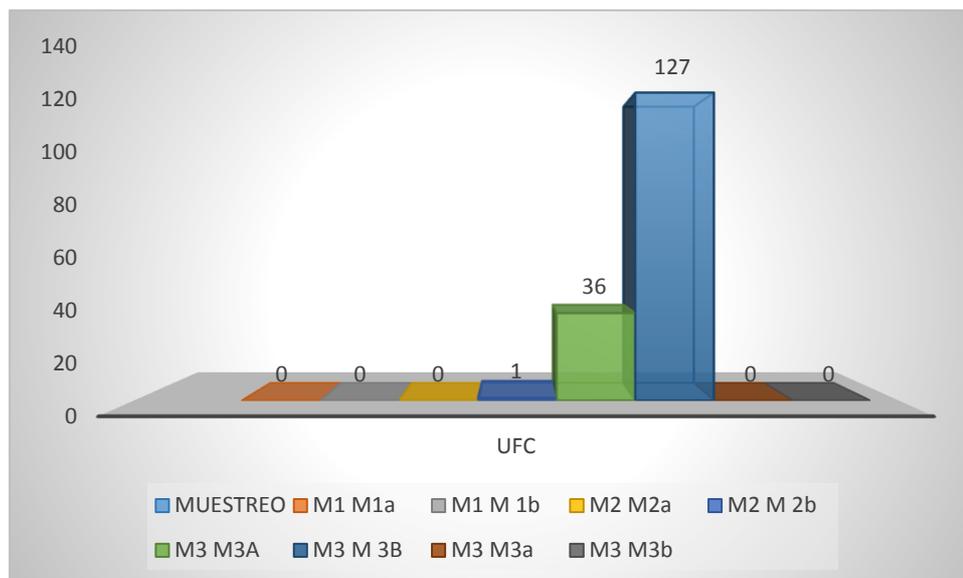
3.2.1 Recuento de Bacterias Aerobias Mesófilas

Tabla 2-3: Recuento de Bacterias Aerobias Mesófilas

SITIO DE	MUESTRA	UFC	
----------	---------	-----	--

MUESTREO			MEDIA
M ₁	M1a	0	0
	M 1b	0	
M ₂	M2a	0	1
	M 2b	1	
M ₃	M3A	36	81,5
	M 3B	127	
	M3a	0	0
	M3b	0	

Realizado por: Erica Guamán, 2018



Gráfica: 1-3: Recuento de Bacterias de Aerobias Mesófilas

Realizado por: Erica Guamán, 2018

En la tabla 2-3 se describe el crecimiento bacteriano del ojo de fuente en la piscina natural 1 de las muestra M3A con 36 UFC/mL y M3 B 127 UFC/mL, obtenidas a partir del agua a temperatura de 44° C, mientras las muestras a 37 °C (M1a, M1b, M2a, M2b, M3a, M3b) presentaron un menor crecimiento, la existencia numerosa de bacterias aerobias mesófilas según el criterio de Andueza., 2014 es una demostración de contaminación. Criterio que al igual que la NORMA DE CALIDAD AMBIENTAL Y DE DESCARGA DE AFLUENTES resaltan que la presencia de aerobios mesófilos son Indicadores de Contaminación. (Andueza., 2014. p.19)

En el 2008, Mosso, Ma, Ángeles [et al], investiga la microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario de Valdelateja, donde reporta que en el punto de emergencia de los manantiales, el número de bacterias heterotrófas y oligotrofas aerobias viables, ha sido inferior a 10 ufc/mL, y el de bacterias esporuladas inferior a 5 ufc/mL.

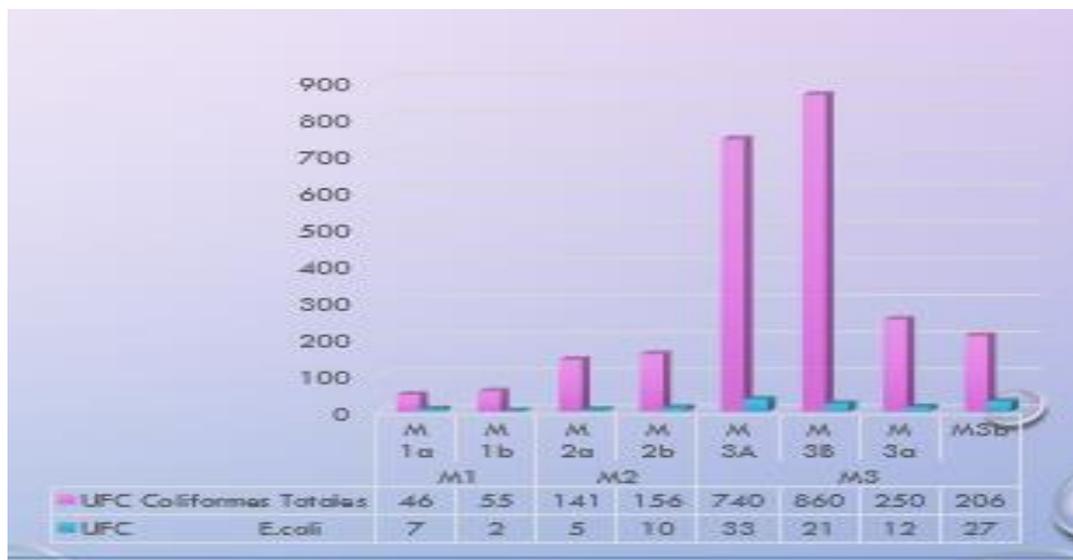
Se observa en la figura 2-3 que las muestras M2 y M1, presenta un bajo crecimiento bacteriano 1 UFC/mL al igual que los estudio de Mosso, 2008 por el lugar de la toma de muestra de agua es más natural pues emerge de un sitio subterránea hacia las piscinas.

3.2.2 Recuento de Bacterias en el Análisis Microbiológico *E. coli*/ Coliformes Totales.

Tabla 3-3: Recuento de Bacterias *E. coli* y Coliformes Totales

SITIO DE MUESTREO	MUESTRA	UFC Coliformes Totales	UFC <i>E.coli</i>	MEDIA
M1	M 1 ^a	46	7	50,5
	M 1b	55	2	
M2	M 2 ^a	141	5	148,5
	M 2b	156	10	
M ₃	M 3 ^a	740	33	800
	M 3B	860	21	
	M 3 ^a	250	12	228
	M3b	206	27	

Realizado por: Erica Guamán, 2018



Gráfica: 2-3: Recuento de Bacterias en el Análisis Microbiológico *E. coli* / Coliformes T.

Realizado por: Erica Guamán, 2018

Se observa en la tabla 3-3 que en la muestra M3 registró la mayor cantidad de coliformes totales (860 UFC/ mL) en relación a M2 y M1 con 156 UFC/ mL y 55 UFC/ mL respectivamente, la causa principal se puede deber a que en M3 es una zona con infiltraciones en el suelo de agua contaminada del exterior de la piscina.

En la norma técnica Ecuatoriana NTE INEN 1108. 2014 de agua potable, (requisitos) menciona que en 100 mL de agua no debe existir presencia de coliformes fecales, al igual que en la norma Mexicana NOM-127-SSA1 de agua para uso y consumo humano. (Nom, 1994)(Inen, 2014)

En la tabla 3-3 para la fuente M1 los resultados del recuento de *Escherichia coli* muestran 7 UFC/ mL, en M2 de 10 UFC/ mL, en M3 es de 33 UFC/ mL, indican que existe crecimiento en los tres sitios de muestreo y que su presencia es un indicador de contaminación.

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 mostró la presencia de *E. coli.*, lo cual puede deberse a que este lugar está en contacto directo con microbiota que proviene de otros hábitats como es la vegetación, el suelo, animales entre otros que pueden ser los causantes de esta contaminación.

Yepes, 2004 realizó un estudio de la calidad microbiológica y físico-química de las aguas utilizadas con fines recreativos de las Playas de Bocagrande y Marbella en Cartagena de Indias (Colombia) en cuanto a parámetros microbiológicos el promedio de coliformes totales superó el rango normal, permitiéndole concluir que la calidad microbiológica de estas aguas podría estar asociada a la aparición de enfermedades. Por consiguiente en nuestro estudio la fuente presenta una mínima cantidad de coliformes que podría ocasionar enfermedades, el uso de este sitio sería responsabilidad del usuario ya que no tiene una infraestructura adecuada.

3.2.3 Recuento de Bacterias *Staphylococcus*

Tabla 4-3: Resultados de la estimación del número de *Staphylococcus*

SITIO DE MUESTREO	MUESTRA	UFC	MEDIA
M1	M1a	59	55.5
	M1b	52	
M2	M 2 ^a	35	33
	M 2b	31	
M3	M 3 ^a	9	15.5
	M 3B	14	
	M 3 ^a	5	
	M 3b	3	

Realizado por: Erica Guamán, 2018

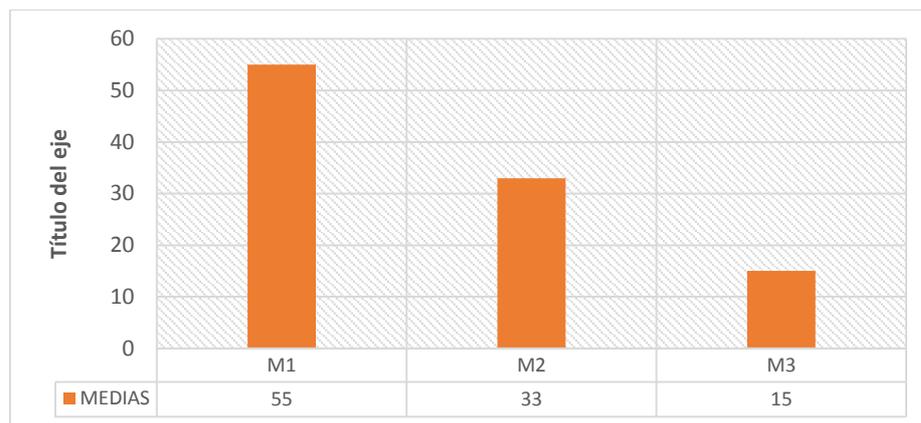


Gráfico 3-3: Resultados de la estimación del número de *Staphylococcus*
Realizado por: Erica Guamán, 2018

En la tabla 4-3 Los *Staphylococcus* se desarrollan en ambientes salinos a 37-38°C condiciones que favorecen a su crecimiento como es el caso de las fuentes M1, M2 y la fuente M3 donde se encuentra un bajo crecimiento de *Staphylococcus*.

MARTÍN et al., 1992 realizaron un estudio microbiológico y químico del agua de las Piscinas de la Isla de Tenerife sometida una de ellas a cloración y filtración. Entre los parámetros microbiológicos que analizaron, está el recuento *Staphylococcus aureus* encontrando la presencia de 15 UFC/mL demostrando la resistencia de esta especie a altas concentraciones salinas por lo que concluyeron que este recuento debería tomarse como indicador microbiológico dentro de la calidad sanitaria de las aguas por las diversas patologías que pudiera causar en la especie humana. En nuestro estudio la cantidad encontrada en uno de los dos puntos donde emerge el agua termal fue inferior a 10 UFC/mL, además difiere en cuanto a la procedencia y tratamiento ya que la analizada en el estudio de Martin et al fue en aguas sometidas a cloración, en nuestro caso es del punto donde emerge el agua sin tratamiento previo, pudiendo decirse que es la microflora propia del agua termal.

3.2.4 Recuento de Mohos y levaduras

Tabla 5-3: Recuento de Mohos y levaduras

SITIO DE MUESTREO	MUESTR A	UFC	MEDIA
M ₁	M 1a	0	0
	M1b	0	
M ₂	M 2a	0	0
	M 2b	0	
M ₃	M 3A	49	56.5
	M 3B	64	
	M 3a	0	43
	M 3b	43	

Realizado por: Erica Guamán, 2018

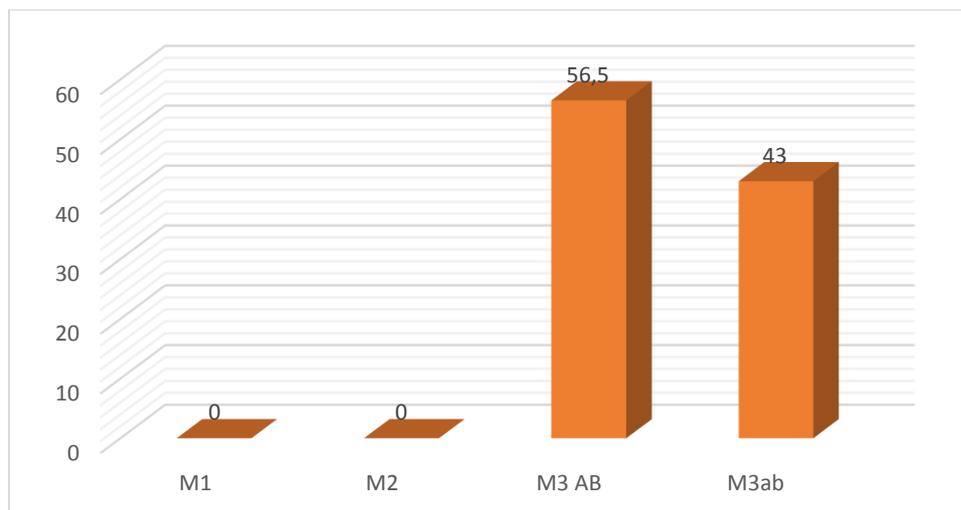


Gráfico 4-3: Recuento de Mohos y levaduras
 Realizado por: Erica Guamán, 2018

En la tabla 5-3 En el caso de las levaduras y mohos en M1 y M2 sitio de muestreo donde emerge el agua subterránea no se obtuvieron colonias bacterianas, en M3 se obtuvo un valor alto de (56.5 – 43 UFC/mL) esta es la piscina que contiene infiltraciones externas de agua de río que provocan la contaminación.

Encontramos mohos y levadura cuyo desarrollo fue en un ambientes aerobios a pH 7 y temperatura entre 38-44°C estas condiciones fueron favorables para su crecimiento.

3.3 Recuento de Bacterias Gram (+) y Gram (-)

Tabla 6-3: Recuento de Bacterias Gram (+) y Gram (-)

SITIO DE MUESTREO	TINCION GRAM	
	COCOS GRAM (+)	BACILOS GRAM(-)
M1	3	11
M2	1	12
M3	4	10
TOTAL	8	33
PORCENTAJE	19.52 %	80.48 %

Realizado por: Erica Guamán, 2018

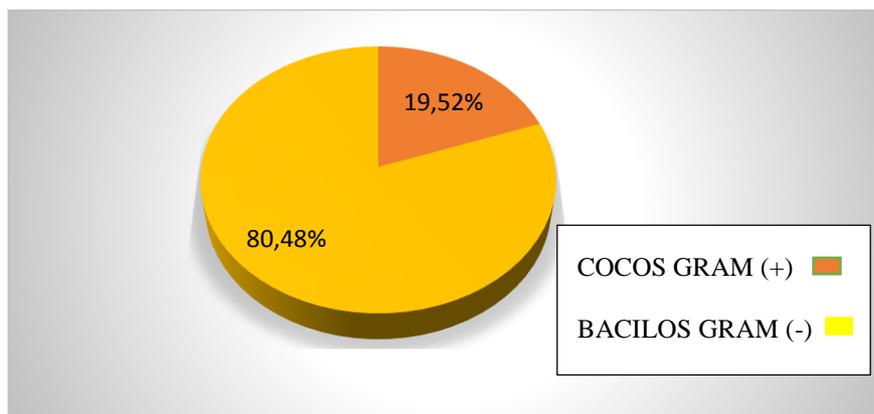


Gráfico 5-3: Recuento de Bacterias Gram (+) y Gram (-).
Realizado por: Erica Guamán, 2018

La evaluación de la microbiota de las fuentes (tabla 6-3) mostro en todos los casos el predominio de bacterias Gram (-) con un 80,48% y un porcentaje bajo de Cocos Gram Positivos con un 20%. Estos resultados son semejantes a los del estudio de Flores quien encontró en los manantiales termales de la localidad de Mitisus y Santa Apolonia en Mérida, Venezuela, que en las aguas de estos balneario existe un predominio alto de bacterias Gram (-) con un 88.33%, y una baja presencia de bacterias Gram positivas con un 16.66%. (Flores., 2013, p.51).

3.4 Descripción Macroscópica de las colonias Bacterianas aisladas de las Aguas Termales.

La morfología macroscópica de un total de 41 aislamientos puros, tomados a partir del cuarto repique, realizando así la estabilización de clones. Se muestran en las tablas 7-3, 8-3 y 9-3.

Tabla 7-3: Morfología macroscópica de las colonias bacterianas de la muestra M1

N° Clon	Temperatura	Colonia	Borde	Elevación	Superficie	Consistencia	Color	Tamaño
1	37°C	Rizoide	Rizada	Elevada	Rugosa	Membranosa	Blanco	5mm
3	37°C	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Creмоса	Amarillo	1,2mm
3	44°C	Circular	Entero	Plana	Lisa	Creмоса	Azul	6mm
4	37°C	Circular	Entero	Plana	Lisa	Creмоса	Amarilla	7mm
5	37°C	Rizoide	Rizada	Elevada	Rugosa	Membranosa	Blanco	5mm
15	37°C	Circular	Entero	Plana	Lisa	Creмоса	Azul	6mm
16	37°C	Rizoide	Rizada	Elevada	Rugosa	Membranosa	Blanco	5mm
17	37°C	Irregular	Ondulada	Plana	Lisa	Creмоса	Amarillo Claro	2,5mm
18	37°C	Irregular	Ondulada	Plana	Rugosa	Membranosa	Amarillo crema	9mm
19	37°C	Irregular	Entero	Plana	Rugosa	Membranosa	Amarilla	3mm
20	37°C	Circular	Entero	Plana	Lisa	Creмоса	Azul	6mm
21	37°C	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Creмоса	Amarillo	1,2mm
22	37°C	Irregular	Ondulada	Plana	Rugosa	Membranosa	Crema	5mm
30	37°C	Irregular	Ondulada	Plana	Rugosa	Membranosa	Amarillo crema	9mm

Realizado por: Erica Guaman, 2018

Tabla 8-3: Morfología macroscópica de las colonias bacterianas de la muestra M2

N° Clon	Temperatura	Colonia	Borde	Elevación	Superficie	Consistencia	Color	Tamaño
2	37°C	Circular	Entero	Plana	Lisa	Cremosa	Crema	3mm
7	44°C	Irregular	Ondulada	Plana	Rugosa	Membranosa	Crema	5mm
8	44°C	Irregular	Ondulada	Plana	Rugosa	Membranosa	Crema	5mm
9	44°C	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Cremosa	Amarillo	1,2mm
10	44°C	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Cremosa	Amarillo	1,2mm
12	37°C	Rizoide	Rizada	Elevada	Rugosa	Membranosa	Blanco	5mm
13	37°C	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Cremosa	Amarillo	1,2mm
14	37°C	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Cremosa	Amarillo	1,2mm
23	37°C	Irregular	Ondulada	Plana	Rugosa	Membranosa	Crema	5mm
24	37°C	Irregular	Ondulada	Plana	Rugosa	Membranosa	Amarillo crema	9mm
25	37°C	Rizoide	Rizada	Elevada	Rugosa	Membranosa	Blanco	5mm
26	37°C	Irregular	Ondulada	Plana	Rugosa	Membranosa	Amarillo crema	9mm
27	37°C	Rizoide	Rizada	Elevada	Rugosa	Membranosa	Blanco	5mm

Realizado por: Erica Guaman, 2018

Tabla 9-3: Morfología macroscópica de las colonias bacterianas de la muestra M3

N° Clon	Temperatura	Colonia	Borde	Elevación	Superficie	Consistencia	Color	Tamaño
1	44°C	Irregular	Ondulada	Plana	Rugosa	Membranosa	Amarillo Claro	9mm
2	44°C	Circular	Entero	Plana	Lisa	Cremosa	Azul	6mm
4	44°C	Irregular	Ondulada	Plana	Rugosa	Membranosa	Amarillo Claro	9mm
5	44°C	Irregular	Ondulada	Plana	Rugosa	Membranosa	Crema	5mm
6	37°C	Circular	Entero	Plana	Lisa	Cremosa	Crema	3mm
6	44°C	Irregular	Ondulada	Plana	Rugosa	Membranosa	Crema	5mm
7	37°C	Circular	Entero	Plana	Lisa	Cremosa	Crema	3mm
8	37°C	Irregular	Ondulada	Plana	Rugosa	Membranosa	Crema	5mm
9	37°C	Rizoide	Rizada	Elevada	Rugosa	Membranosa	Blanco	5mm
10	37°C	Rizoide	Rizada	Elevada	Rugosa	Membranosa	Blanco	5mm
11	37°C	Circular	Entero	Plana	Lisa	Cremosa	Azul	6mm
11	44°C	Irregular	Ondulada	Plana	Lisa	Cremosa	Amarillo Claro	2,5mm
28	37°C	Circular	Entero	Plana	Lisa	Cremosa	Azul	6mm
29	37°C	Circular	Entero	Plana	Lisa	Cremosa	Amarilla	7mm

Realizado por: Erica Guaman, 2018

Observándose una gran variabilidad morfológica de los 41 clones aislados los que presentan: colonias (circulares, Rizoide e Irregular), bordes (ondulados y enteros), una elevación (plana y elevada), superficie (rugosa y lisa), su consistencia (membranosa y cremosa), el color varia (amarillo claro, amarillo, azul, crema, blanco), y su tamaño oscila entre 2.5mm – 9mm.

3.5 Resultado de la determinación de pruebas bioquímicas para los clones puros Cocos

Gram (+) y Bacilos Gram (-)

A los clones bacterianos se les realizó una serie de pruebas bioquímicas las cuales permitieron la identificación de los microorganismos.

Tabla 10-3: Resultados de la determinación de Pruebas Bioquímicas para los clones de la muestra M1.

Origen	Clon	1	3	3	4	5	15	16	17	18	19	20	21	22	30	
	Temperatura	37° C	37° C	44° C	37° C											
Preparación de Agar Mueller Hinton	Agua de Fuente	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.	
	Agua Destilada	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
Pruebas	Tinción Gram	BG (-)	BG (-)	BG (-)	CG (+)	BG (-)	CG (+)	BG (-)	BG (-)	CG (+)	BG (-)					
	Catalasa	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	
	Oxidasa	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	
	OF	Ox	Ox	Fer	Ine	Ox	Fer	Fer	Ox	Ox	Fer	Ox	Ox	Ine	O/F	
	Kliger: Glucosa Lactosa Gas	Glucosa	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
		Lactosa	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-
		Gas	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-
	Sim: Indol Movilidad H2S	Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Movilidad	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
		H2S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Úrea	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-		
Citrato	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	
Macconkey	C	C	C	N.A	C	C	C	C	C	C	C	C	C	N.A	C	
EAM	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	
Manitol	N.A	N.A	N.A	N.C	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	Fer	N.A	N.A	N.C	N.A	
Género y Especie		1	5	2	8	1	2	3	6	1	9	4	6	8	4	
Porcentaje		100 %	86 %	94 %	85 %	100 %	94 %	89 %	92 %	100 %	93 %	92 %	92 %	85 %	92 %	

N.A: No Aplica A: Aplica **BG(-):** Bacilos Gram Negativos **CG(+):** Cocos Gram Positivo **Ox:** Oxida
Fer: Fermenta **O/F:** Oxida y Fermenta **C:** Crecimiento **N.C:** No crece **Ine:** Inerte

1: *Aeromonas aeruginosa* **2:** *Escherichia coli* **3:** *Enterobacter aerogenes* **4:** *Aeromonas schubertii*
5: *Pseudomonas stutzeri* **6:** *Brevundimonas diminuta* **7:** *Staphylococcus aureus* **8:** *Micrococcus luteus*
9: *Enterococcus flavescens*

Realizado por: Erica Guamán, 2018

Tabla 11-3: Resultados de la determinación de Pruebas Bioquímicas para clones de la muestra M2.

Origen	Clon	2	7	8	9	10	12	13	14	23	24	25	26	27
	Temperatura	37° C	44° C	44° C	44° C	44° C	44° C	37° C						
Preparación de Agar Mueller Hinton	Agua de Fuente	N. A.	N.A.	N. A.										
	Agua Destilada	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Pruebas	Tinción Gram	CG (+)	BG (-)	BG (-)	BG(-)	BG (-)	BG(-)	BG (-)						
	Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Oxidasa	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	OF	Fer	Ox	Fer	O/F	Fer	Ox	Ox	Fer	Fer	O/F	Ox	O/F	Ox
	Kliger: Glucosa Lactosa Gas	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+
		-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+
		-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+
	Sim: Indol Movilidad H2S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Urea	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+
	Citrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
MacConkey	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	
EAM	N. A.	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	
Manitol	Fer	N.A.	N. A.	N.A.	N. A.	N.A.	N. A.							
Género y especie	7	1	3	1	3	1	5	3	3	4	1	4	1	
Porcentaje	91 %	100 %	89 %	100 %	89 %	100 %	86 %	89 %	89 %	92 %	100 %	92 %	100 %	
N.A.: No Aplica A: Aplica BG(-): Bacilos Gram Negativos CG(+): Cocos Gram Positivo Ox: Oxida Fer: Fermenta O/F: Oxida y Fermenta C: Crecimiento N.C: No crece Ine: Inerte 1: <i>Aeromona aeruginosa</i> 2: <i>Escherichia coli</i> 3: <i>Enterobacter aerogenes</i> 4: <i>Aeromona schubertii</i> 5: <i>Pseudomonas stutzeri</i> 6: <i>Brevundimonas diminuta</i> 7: <i>Staphylococcus aureus</i> 8: <i>Micrococcus luteus</i> 9: <i>Enterococcus faecalis</i>														

Realizado por: Erica Guaman, 2018

Tabla 12-3: Resultados de la determinación de Pruebas Bioquímicas para clones de la muestra M3.

Origen	Clon	1	2	4	5	6	6	7	8	9	10	11	11	28	29
	Temperatura	44° C	44° C	44° C	44° C	44° C	44° C	37° C	37° C	37° C	37° C	37° C	44° C	37° C	37° C
Preparación de Agar Mueller Hinton	Agua de Fuente	N. A.	N. A.	A.	A.	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.	A.	A.	A	A	N. A.	N. A.
	Agua Destilada	A	A	N. A.	N. A.	A	A	A	A	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.	A	A
Tinción Gram	BG (-)	BG (-)	BG (-)	BG (-)	BG (-)	BG (-)	CG (+)	CG (+)	BG (-)	BG (-)	BG (-)	BG (-)	CG (+)	BG (-)	CG (+)

Pruebas	Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
	Oxidasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	OF	O/F	Fer	Fer	Fer	Fer	Fer	Fer	Fer	Ox	Ox	Ox	Fer	Ox	Ine
	Kliger: Glucosa Lactosa Gas	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-
		-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-
		-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-
	Sim: Indol Movilidad ad H2S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Urea	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Citrato	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	
MacConkey	C	C	C	C	C	N.A	N.A	C	C	C	C	C	C	N.A	
EAM	C	C	C	C	C	N.A	N.A	C	C	C	C	C	C	N.A	
Manitol	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	Fer	Fer	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	
Género y especie	4	2	5	1	2	7	7	2	1	1	6	9	2	8	
Porcentaje	92%	89%	86%	100%	89%	91%	91%	89%	100%	100%	92%	93%	94%	85%	
<p>N.A: No Aplica A: Aplica BG(-): Bacilos Gram Negativos CG(+): Cocos Gram Positivo Ox: Oxida Fer: Fermenta O/F: Oxida y Fermenta C: Crecimiento N.C: No crece Ine: Inerte 1: <i>Aeromona aeruginosa</i> 2: <i>Escherichia coli</i> 3: <i>Enterobacter aerogenes</i> 4: <i>Aeromona schubertii</i> 5: <i>Pseudomonas stutzeri</i> 6: <i>Brevundimonas diminuta</i> 7: <i>Staphylococcus aureus</i> 8: <i>Micrococcus luteus</i> 9: <i>Enterococcus flavescens</i></p>															

Realizado por: Erica Guamán, 2018

En la tabla 10-3, 11-3 y 12-3 se presentan las características bioquímicas de los clones aislados a partir de las muestra M1, M2 y M3. Las *Pseudomonas* colonizan de manera rápida y pueden tolerar altas temperaturas. El mayor número de especies identificadas en nuestra investigación corresponden a *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas stutzeri*, con una pigmentación de colonias verdosas brillante y cremosas, seguidas por *Enterobacter aerogenes* y *Escherichia coli*.

Martínez, indica que las *Pseudomonas* son Bacilos Gram (-) cuyas colonias tienen un aspecto verde y cremoso con bordes elevados, y pequeña diseminación de sus halos. (Martínez, 2007).

En los Balnearios de Viesgo y Jaraba el análisis microbiológico, reporta la presencia de *Pseudomonas stutzeri*, la misma que es habitual en aguas minerales ya que son bacterias que tienen gran tolerancia a elevadas temperaturas y pocos requerimientos nutricionales por lo que son capaces de sobrevivir y desarrollarse en ambientes oligotróficos. (De la Rosa, 2007)

En nuestro estudio se identificaron (tabla 10-3 y 12-3), bacterias de las especies *Echerichia coli* y *Enterobacter aerogene*, la primera es un indicador de contaminación fecal en agua y crece en

el intestino de aves y mamíferos, por lo que su uso es un potencial riesgo para la salud humana. (Apella et al., Araujo et al.; 2015, p47)

El género *Aeromonas* bacilo Gram negativo que tolera elevadas temperaturas (45°C). Son catalasa positiva y oxidasa positivos, de variable movilidad, la especie aislada corresponde *Aeromonas schubertii*, su relevante diferencia de las demás especies de este género es el indol negativo y la movilidad positiva, diferencia significativa para su identificación. (Rocha, et al., 2006, p. 239)

Los clones 11 proveniente de M3 y de M1 17 - 21 están identificados como *Brevundimonas diminuta* bacteria cuyo crecimiento fue notorio en cultivos selectivos como MacConkey y Eosina azul de metileno además presento catalasa variable, movilidad positiva, oxidasa positiva, y oxidante de glucosa en la prueba OF.

Según Rocha publica que la especie *Brevundimonas diminuta* se diferencia de la especie *Brevundimonas vesicularis* por su crecimiento en agar MacConkey resultado semejante a nuestro estudio de investigación. (Rocha, et al., 2006, p. 239)

El *Staphylococcus aureus* se identificó por su fermentación en Manitol, significativa característica, mientras que el *Enterococcus flavescens* fue identificado por pruebas de catalasa negativa, crecimiento en Eosina Azul de Metileno y MacConkey.

La descripción que señala Martínez en el año 2007 para los Cocos Gram (+) del genero de *Staphylococcus*, dice, que estos presentan catalasa positiva y fermentación en Manitol, diferenciándolo de géneros como *Streptococcus* y *Enterococcus*, por la catalasa un enzima que se encuentra presente en la mayoría de microorganismos aerobios, facultativos y anaerobios (aero-tolerantes). (Martínez, 2007)

3.6 Identificación de bacterias

La identificación de los 41 clones aislados en este estudio mostro que 11 clones corresponden a la familia de *Pseudomonas aeruginosas*, 6 *Escherichia coli*, 5 *Enterobacter aerogenes*, 5 *Aeromonas schubertii*, 3 *Pseudomonas stutzeri*, 3 *Brevundimonas diminuta*, 3 *Staphylococcus aureus*, 3 *Micrococcus luteus* y 2 *Enterococcus flavescens*, presentándose bacterias que indican la contaminación por heces (*Escherichia coli*), y bacterias patógenas como las *Pseudomona aeruginosa* que causan patologías agudas y graves representando un potencial riesgo sanitario para los turistas que usan estas aguas recreacionales.

En un estudio sobre la microbiología de las aguas termales del Balneario de Jaraba en el año 2004, De la Rosa, identificó bacterias Gram negativas no fermentadoras destacando: *Burkholderia cepacia*, *Ochrobactrum anthropi*, *Brevundimonas*, *Comamonas*, *Sphingomonas* y *Stenotrophomonas*. Encontraron además cocos gram positivos en muy baja proporción, el género identificado fue *Staphylococcus* señalado que su presencia en aguas es frecuente. Los géneros de microorganismos aislados en nuestra investigación se asemejan con este estudio. (De La Rosa et al., 2004)

Tabla 13-3: Resultados de las bacterias identificadas de los clones en las aguas termales.

MUESTRA	TEMPERATURA	N° CLON	BACTERIAS	
			GENERO	ESPECIE
M1	37°C	1	<i>Pseudomonas</i>	<i>Aeruginosa</i>
	37°C	3	<i>Pseudomonas</i>	<i>Stulzeri</i>
	44°C	3	<i>Escherichia</i>	<i>Coli</i>
	37°C	4	<i>Micrococcus</i>	<i>luteus</i>
	37°C	5	<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>
	37°C	15	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>
	37°C	16	<i>Enterobacter</i>	<i>aerogenes</i>
	37°C	17	<i>Brevundimonas</i>	<i>diminuta</i>
	37°C	18	<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>
	37°C	19	<i>Enterococcus</i>	<i>flavescens</i>
	37°C	20	<i>Aeromonas</i>	<i>schubertii</i>
	37°C	21	<i>Brevundimonas</i>	<i>diminuta</i>
37°C	22	<i>Micrococcus</i>	<i>luteus</i>	
37°C	30	<i>Aeromonas</i>	<i>schubertii</i>	
M2	37°C	2	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>
	44°C	7	<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>
	44°C	8	<i>Enterobacter</i>	<i>aerogenes</i>
	44°C	9	<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>
	44°C	10	<i>Enterobacter</i>	<i>aerogenes</i>
	37°C	12	<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>
	37°C	13	<i>Pseudomonas</i>	<i>stulzeri</i>
	37°C	14	<i>Enterobacter</i>	<i>aerogenes</i>
	37°C	23	<i>Enterobacter</i>	<i>aerogenes</i>
	37°C	24	<i>Aeromonas</i>	<i>schubertii</i>
	37°C	25	<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>
	37°C	26	<i>Aeromonas</i>	<i>schubertii</i>
37°C	27	<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>	
M3	44°C	1	<i>Aeromonas</i>	<i>schubertii</i>
	44°C	2	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>
	44°C	4	<i>Pseudomonas</i>	<i>stulzeri</i>
	44°C	5	<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>
	37°C	6	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>
	44°C	6	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>
	37°C	7	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>
	37°C	8	<i>Escherichia</i>	<i>Coli</i>
	37°C	9	<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>
	37°C	10	<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>
	44°C	11	<i>Enterococcus</i>	<i>flavescens</i>
	37°C	11	<i>Brevundimonas</i>	<i>diminuta</i>
37°C	28	<i>Escherichia</i>	<i>Coli</i>	
37°C	29	<i>Micrococcus</i>	<i>Luteus</i>	

Realizado por: Erica Guamán, 2018

En las piscinas M2 y M1 encontramos *Pseudomonas stutzeri* considerada una bacteria oportunista que en pocos casos provoca enfermedades graves, la especie identificada también fue *Enterococcus flavescens* bacteria que tolera elevadas concentraciones de sales y altas temperaturas, adaptándose al medio, pocas veces es considerada como un agente infeccioso.

La *Brevundimonas diminuta* se encontró en las aguas termales “Ojo de Fantasma” creciendo a temperaturas entre 35°C y 37°C, son microorganismos ambientales de agua y suelo. Otra especie identificada es la *Aeromonas schubertii* que es capaz de tolerar temperaturas de hasta 45°C.

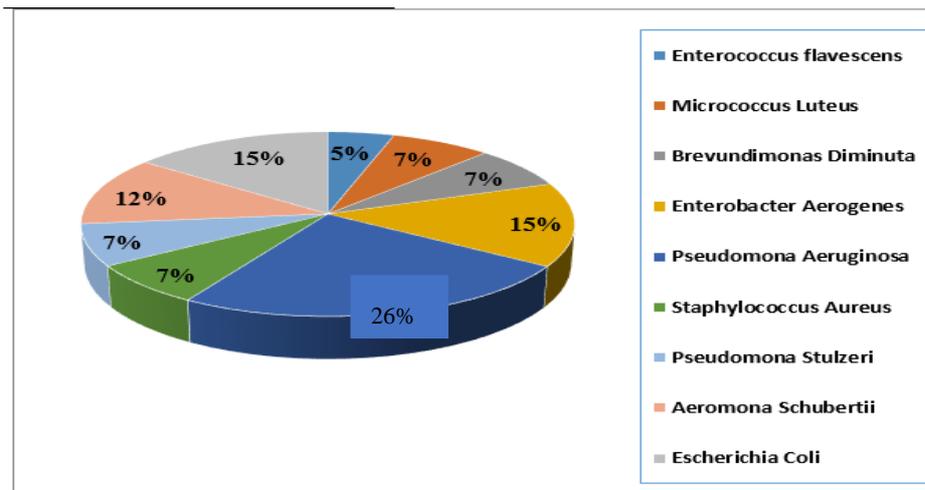
3.6.1 Porcentaje de especies encontradas en las aguas termales.

La *Pseudomonas Aeruginosa* se encuentra en mayor porcentaje con 26.8%. Su presencia se debe a la exposición de la fuente al ambiente contaminado, también por desbordes del río y deslaves de la montaña que acarrearán restos vegetales del suelo.

Tabla 14-3: Porcentaje de especies encontradas en las aguas termales.

GENERO	ESPECIE	# DE BACTERIAS	PORCENTAJE
<i>Pseudomonas</i>	<i>Aeruginosa</i>	11	26,8%
<i>Escherichia</i>	<i>Coli</i>	6	14,6%
<i>Aeromonas</i>	<i>Schubertii</i>	5	12,19%
<i>Enterobacter</i>	<i>Aerogenes</i>	5	12,19%
<i>Micrococcus</i>	<i>Luteus</i>	3	7,3%
<i>Brevundimonas</i>	<i>Diminuta</i>	3	7,3%
<i>Staphylococcus</i>	<i>Aureus</i>	3	7,3%
<i>Pseudomonas</i>	<i>Stutzeri</i>	3	7,3%
<i>Enterococcus</i>	<i>Flavescens</i>	2	4,8%

Realizado por: Erica Guamán, 2018



Gráfica: 6-3: Porcentaje de especies encontradas en las aguas termales.

Realizado por: Erica Guamán, 2018

El 14,6% de las especies encontradas corresponden a *Escherichia coli* debido probablemente a que la fuente se ubica en una zona expuesta sin cuidado alguno de agentes contaminantes, donde humanos y animales contaminan la piscina por ejemplo a través de sus heces.

Enterobacter aerogenes está presente en un 12,19%, esta bacteria puede causar infecciones: cutáneas, urinarias e intrabdominales. (Martínez, 2007).

3.7 Determinación de la Resistencia a Antibióticos de los aislados bacterianos identificados.

Tabla 15-3: Determinación de la Resistencia a Antibióticos de los aislados bacterianos identificados en la muestra M1

N° Clon	Temperatura	Nombres	ANTIBIÓTICOS													# R
			AM C 20/1 0	IM P 10	C N 10	A M 10	E 1 5	V A 30	T E 30	A K 30	CI P 5	K 3 0	P 1 0	K F 30		
1	37°C	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	2	
3	37°C	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	
3	44°C	<i>Escherichia coli</i>	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	3	
4	37°C	<i>Micrococcus luteus</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	
5	37°C	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	1	
15	37°C	<i>Escherichia coli</i>	R	R	S	R	S	R	R	S	S	R	R	R	8	
16	37°C	<i>Enterobacter aerogenes</i>	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	2	
17	37°C	<i>Brevundimonas diminuta</i>	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	1	
18	37°C	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	
19	37°C	<i>Enterococcus flavescens</i>	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	1	
20	37°C	<i>Aeromonas schubertii</i>	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	2	
21	37°C	<i>Brevundimonas diminuta</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	
22	37°C	<i>Micrococcus luteus</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	
30	37°C	<i>Aeromonas schubertii</i>	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1	
RESISTENCIA			4	2	0	6	0	2	1	0	0	1	4	1		
R: Resistente S: Sensible #R: Número de antibióticos que muestran resistencia CN: Gentamicina 10mcg IPM: Imipenem 10 mcg AMC: Amoxicilina/Ácido Clavulánico 20/10 AM: Ampicilina 10mcg E: Eritromicina 15mcg VA: Vancomicina 30mcg TE: Tetraciclina 30mcg AK: Amikacina 30mcg CIP: Ciprofloxacina 5mcg K: Kenamicina 30mcg P: Penicilina 10mcg																

KF: Cefalotina 30mcg

Realizado por: Erica Guamán, 2018

La valoración de Resistencia Bacteriana de los clones aislados de las fuentes mostro que la especie *Enterococcus flavescens* presento sensibilidad a todos los antibióticos utilizados (Gentamicina, Imipenem, Amoxicilina/Ácido Clavulánico, Ampicilina, Eritromicina, Vancomicina, Tetraciclina, Amikacina, Ciprofloxacina, Kenamicina, Penicilina, Cefalotina.). *Staphylococcus aereus* de igual manera presento sensibilidad a la mayoría de antibióticos mostrando resistencia ante la Ampicilina, la especie *Micrococcus luteus* presento sensibilidad a: Gentamicina, Imipenem, Eritromicina, Vancomicina, Tetraciclina, Kenamicina, Penicilina, Cefalotina y Resistencia a Amoxicilina/Ácido Clavulánico y Ampicilina.

La *Aeromonas schubertii* en nuestro estudio presenta sensibilidad a antibióticos como: Gentamicina, Imipenem, Eritromicina, Vancomicina, Tetraciclina, Amikacina, Ciprofloxacina, Kenamicina, Cefalotina utilizados pero con una variable resistencia a la amoxicilina y penicilina.

Los estudios sobre resistencia a antibióticos de la *Aeromonas schubertii* son muy pocos por la dificultad que representa un aislamiento de una muestra clínica, pero hay investigaciones de su resistencia a antibióticos como: cefalotina y sulfonamida, de las cepas aisladas de pacientes con cuadros diarreicos agudos. (Bravo et al., 2010)

En este estudio se aislaron cuatro clones de *Aeromonas schubertii* (tabla 15-3, 16-3, y 17-3) las cuales presentaron resistencia a la Amoxicilina/Acido clavulonico (30,1), penicilina (24) y amoxicilina, penicilina (20).

Laura Bravo señala en su investigación en el año 2010 sobre Caracterización fenotípica y factores de virulencia en cepas de *Aeromonas* aisladas de pacientes con enfermedad diarreica aguda en Cuba, la presencia de resistencia a antibióticos como: penicilina, amoxicilina, carbenicilina, cefalotina y sensibilidad a: amikacina, aztreonam, ceftazidima, ceftriaxona, ciprofloxacina y gentamicina. (Bravo et al., 2010)

Tabla 16-3: Determinación de la Resistencia a Antibióticos en la muestra M2

N° Clon	Temperatura	Nombres	ANTIBIOTICOS												
			AMC 20/10	IM P 10	C N 10	A M 10	E 1 5	V A 30	T E 30	A K 30	CI P 5	K 3 0	P 1 0	K F 30	# R
2	37°C	<i>Staphylococcus aereus</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	1
7	44°C	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0

8	44°C	<i>Enterobacter aerogenes</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
9	44°C	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1
10	44°C	<i>Enterobacter aerogenes</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	1
12	37°C	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R	4
13	37°C	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	1
14	37°C	<i>Enterobacter aerogenes</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
23	37°C	<i>Enterobacter aerogenes</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
24	37°C	<i>Aeromonas schubertii</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
25	37°C	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
26	37°C	<i>Aeromonas schubertii</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	1
27	37°C	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	2
RESISTENCIA			1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	5	2	
R: Resistente S: Sensible #R: Número de antibióticos que muestran resistencia CN: Gentamicina 10mcg IPM: Imipenem 10 mcg AMC: Amoxicilina/Ácido Clavulánico 20/10 AM: Ampicilina 10mcg E: Eritromicina 15mcg VA: Vancomicina 30mcg TE: Tetraciclina 30mcg AK: Amikacina 30mcg CIP: Ciprofloxacina 5mcg K: Kenamicina 30mcg P: Penicilina 10mcg KF: Cefalotina 30mcg															

Realizado por: Erica Guamán, 2018

La evaluación de la resistencia a antibióticos de los clones de *Pseudomonas* aisladas en el presente estudio tabla (15-3 y 16-3) mostro la presencia de clones multi-resistentes (clones 1,12,18 y 7) haciéndose notar el clon siete aislado a 44°C el cual presenta resistencia a cinco antibióticos (Amoxicilina/Ácido Clavulánico, Cefalotina, Ampicilina, Tetraciclina y Penicilina), y los clones 12 y 18 ambos identificados como *Pseudomonas aeruginosa* los cuales presentaron resistencia a cuatro antibióticos el clon 12 (Amoxicilina/Ácido Clavulánico, Cefalotina, Tetraciclina y Penicilina) y el clon 18 (Gentamicina, Ampicilina, Tetraciclina y Penicilina).

Montero en el año 2012, reporto que la especie de bacterias *Pseudomonas aeruginosa* presenta una resistencia natural a ciertos antibióticos, y mantiene una capacidad de obtener resistencia por medio de mutaciones. Su resistencia se produce por su membrana externa, debido a la bomba de expulsión de antibióticos betalactamicos: tetraciclinas, cloranfenicol, macrólidos, fluoroquinolonas, sulfonamidas y trimetropim. (Montero, 2012)

En un estudio realizado por López en el año 2002, a partir de un paciente con endocarditis polimicrobiana de curso subagudo se aisló *Pseudomonas stutzeri* y utilizando la prueba de sensibilidad por el método disco o antibiograma determinan que es sensible a los antibióticos:

amoxicilina-ácido clavulánico, cefalosporinas de tercera generación, aminoglucósidos, quinolonas e imipenem y suelen tener resistencia a cefalosporinas de primera generación. López, et al. (2002)

Tabla 17-3: Determinación de la Resistencia a Antibióticos de las bacterias identificadas en la muestra M3.

N° CLO N 37°C	Temperatura	Nombres	ANTIBIOTICOS													# R
			AM C 20/10	IM P 10	C N 10	A M 10	E 1 5	V A 30	T E 30	A K 30	CI P 5	K 3 0	P 1 0	K F 30		
1	44°C	<i>Aeromonas schubertii</i>	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1	
2	44°C	<i>Escherichia coli</i>	R	R	S	R	S	R	R	S	S	R	S	R	7	
4	44°C	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	
5	44°C	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	
6	44°C	<i>Escherichia coli</i>	R	R	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	4	
6	37°C	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	1	
7	37°C	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	
8	37°C	<i>Escherichia coli</i>	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	3	
9	37°C	<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	R	S	S	R	S	S	R	S	S	S	R	R	5	
10	37°C	<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	
11	37°C	<i>Enterococcus flavescens</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	
11	44°C	<i>Brevundimonas Diminuta</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	
28	37°C	<i>Escherichia coli</i>	R	R	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	4	
29	37°C	<i>Micrococcus luteus</i>	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	2	
RESISTENCIA			7	3	0	6	0	2	2	0	0	3	2	2		
R: Resistente S: Sensible #R: Número de antibióticos que muestran resistencia CN: Gentamicina 10mcg IPM: Imipenem 10 mcg AMC: Amoxicilina/Ácido Clavulánico 20/10 AM: Ampicilina 10mcg E: Eritromicina 15mcg VA: Vancomicina 30mcg TE: Tetraciclina 30mcg AK: Amikacina 30mcg CIP: Ciprofloxacina 5mcg K: Kenamicina 30mcg P: Penicilina 10mcg KF: Cefalotina 30mcg																

Realizado por: Erica Guamán, 2018

Los estudios sobre la *Brevundimonas diminuta*, de los Centros para Control de Enfermedades de los Estados Unidos muestran un perfil de resistencia importante a la ampicilina, así como sensibilidad variable a penicilinas y cefalosporinas de tercera generación (Restrepo et al., 2010).

En comparación con los resultados obtenidos en nuestro estudio en los clones 11 y 21 se identificó a la especie *Brevundimonas diminuta* la cual resulto sensible a todos los antibióticos

entre ellos la penicilina y la cefalosporina, muestran que el clon 17 presenta resistencia a la ampicilina.

Según una investigación por Dworkin en 2006 señala sensibilidad de la *Brevundimonas diminuta* a varios agentes antibiótico, por lo que el tratamiento a pacientes inmunodeprimidos a causa de esta bacteria, fue eficaz con dosis intravenosa de levofloxacin y una dosis por vía oral de ciprofloxacina. (Dworkin, et al., 2006, p. 10)

En un estudio realizado por Lösch, Merino y Alonso en el año 2006 sobre la resistencia antibiótica en la Familia *Enterobacteriaceae* se encontró, resistencia a antibioticos: ampicilina, ampicilina-sulbactama, cefalotina, aminopenicilinas (ampicilina y amoxicilina). (Lösch, Merino & Alonso, 2006, p. 2). En comparación con nuestro estudio esta especie presenta resistencia a antibióticos como: ampicilina, cefalotina.

La evaluación de la resistencia a antibióticos de las bacterias correspondientes a Bacilos Gram Negativos mostró multiresistencia en el caso de la *Escherichia coli* particularmente en los clones 2, 3, 6, 8, 15, 28, el clon 15 presentan Resistencia a 8 antibióticos (Imipenem, Amoxicilina/Ácido Clavulánico, Ampicilina, Vancomicina, Tetraciclina, Amikacina, Ciprofloxacina, Kenamicina, Penicilina ,Cefalotina.) y sensibilidad a Gentamicina, Eritromicina, Amikacina, Ciprofloxacina, los clones 6 y 28 presentaron resistencia a 4 antibióticos Imipenem, Amoxicilina/Ácido Clavulánico, Ampicilina, Kenamicina, y sensibilidad a Gentamicina, Eritromicina, Amikacina, Ciprofloxacina, Penicilina ,Cefalotina, Vancomicina, Tetraciclina, el clon 2 resistente a 7 antibioticos (Imipenem, Amoxicilina/Ácido Clavulánico, Ampicilina, Vancomicina, Tetraciclina, Kenamicina, Cefalotina.) y sensible a Gentamicina, Eritromicina, Amikacina, Ciprofloxacina, Penicilina ,Cefalotina, y los clones 3 y 8 presentaron resistencia a 3 antibióticos Amoxicilina/Ácido, Vancomicina, Penicilina y sensibilidad a (Gentamicina, Imipenem, Clavulánico, Ampicilina, Eritromicina, Tetraciclina, Amikacina, Ciprofloxacina, Kenamicina ,Cefalotina.).

En el estudio realizado en los manantiales de agua en la Región de Al-Ahsa publicado por Alzahrani en 2011 se aislaron cepas de *Escherichia coli*, algunas de las cuales mostraron resistencia a la ampicilina, cloranfenicol, estreptomina, tetraciclina, cotrimoxazol, ácido nalidíxico y ciprofloxacina. (ALZHRANI, A. 2011, p. 124)

En nuestro estudio la *Escherichia coli* presenta resistencia a: Amoxicilina/Acido clavulonico, Ampicilina, Imipenem, Eritromicina, Vancomicina, Tetraciclina, Amikacina, Kenamicina, Cefalotina, existiendo una similitud con el estudio hecho por Alzahrani.

Los cocos Gram positivos en este estudio como: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus flavescens*, *Micrococcus luteus*, mostraron resistencia a la Ampicilina, Amikacina, Amoxicilina/Acido clavulónico observándose el mayor número de clones resistentes (12) ante la Ampicilina y sensibilidad a la gran mayoría de los antibióticos utilizados en este estudio.

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

El primer antibiótico utilizado para el tratamiento de infecciones por *Staphylococcus aureus* fue la penicilina. Adicionalmente como medicamentos de segunda línea se tiene otros betalactámicos como la cefalosporinas de primera y segunda generación además de lincosamidas, cotrimoxazole y macrólidos. (Zarate et al., 2003)

En nuestro estudio la especie *Enterococcus* presento resistencia a la Ampicilina y sensibilidad a los otros antibióticos utilizados: Amoxicilina/Acido clavulónico, Imipenem, Eritromicina, Vancomicina, Tetraciclina, Amikacina, Kenamicina, Cefalotina.

El género *Enterococcus* según los estudios de Juliet en 2012 presenta una alta resistencia natural a múltiples antimicrobianos: cefalosporinas, oxacilinas, clindamicina, lincomicina, cotrimoxazol, aminoglucósidos además su importancia radica en la capacidad de adquirir resistencia a otros antibióticos entre los que se encuentran: ampicilina-penicilina, cloranfenicol, eritromicina, tetraciclinas, quinolonas, vancomicina-teicoplanina, nitrofurantoína, aminoglucósidos. En nuestro caso los clones de *Enterococcus* aislados solo muestran resistencia ante la ampicilina. (Juliet, 2002)

La especie *Micrococcus luteus* aislado en este trabajo presenta resistencia a la Amoxicilina/Acido Clavulánico, cefalotina, ampicilina, y presenta sensibilidad a (Gentamicina, Imipenem, Eritromicina, Vancomicina, Tetraciclina, Kenamicina, Penicilina, Cefalotina.).

Un estudio en las aguas de los manantiales la Mitisús y Santa Apolonia del estado de Mérida, mostró que todos los clones de *Micrococcus* son resistentes a amoxicilina/ácido clavulánico, así

también todos los clones resultaron ser sensibles a la gentamicina al igual que en nuestro estudio. (Flores, S., 2013)

La resistencia que presentan algunos microorganismos puede relacionarse con la presencia de microorganismos autóctonos procedentes de los bañistas o del ambiente, la resistencia antibiótica de estos microorganismos transmitida a las bacterias propias del agua mediante plásmidos, generando un éxito terapéutico mínimo o nulo. (Manual de actualización en resistencia bacteriana y normas, CLSI M100-S20, 2010, p.12)

3.7.1 Porcentaje de Resistencia y Sensibilidad de Bacterias

Tabla 18-3: Porcentaje de Resistencia y Sensibilidad de Bacterias

AGENTE MICROBIANO	BACTERIAS SENSIBLES		BACTERIAS RESISTENTES	
	n°	%	n°	%
Ampicilina (AM)	29	70,73	12	31,70
Amoxicilina/ ácido clavulónico (AMC)	32	78,04	9	21,95
Cefalotina (KF)	35	85,36	6	12,19
Gentamicina (CN)	35	85,36	6	14,63
Imipenem (IPM)	36	87,80	5	12,19
Amikacina (AK)	39	95,12	2	4,8
Ciprofloxacina (CIP)	41	100	0	0
Penicilina(P)	28	69,73	11	30,94
Tetraciclina (TE)	36	87,80	5	12,19
Vancomicina (VA)	37	90,24	4	9,75
Eritromicina (E)	41	100	0	0
Kenamicina (K)	38	92,68	3	7,3

Realizado por: Erica Guaman,2018

En este estudio es de hacer notar que el mayor número de clones resistentes fue obtenido para los antibióticos Ampicilina y Penicilina (31%). Messi, P., et al en el año 2005, reporta resultados de aislamiento de bacterias resistentes a antibióticos, donde más del 80% de las cepas aisladas presentan resistencia a uno o más antibióticos; entre ellos a la Ampicilina con el 55% igual que en nuestro estudio.

CONCLUSIONES

La determinación in-situ de los valores de temperatura y pH en las aguas termales Ojo de Fantasma mostro un promedio de temperatura de 40°C en las tres fuentes y con una temperatura ambiental de 22°C, además presentaron un promedio en su pH de 7.

El 80% (33 clones) de la microbiota aislada de las fuentes termales fueron bacilos Gram negativos, mientras fue un 19,4% identificados como cocos Gram positivos (8 clones).

Las aguas termales presentaron bacterias indicadoras de contaminación fecal (*Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*), al igual que la presencia de bacterias patógenas causantes de infecciones agudas y graves como: *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*), por lo que presentan un riesgo sanitario para los bañistas.

En este estudio se aislaron 6 clones correspondientes a *Escherichia coli* de las cuales los clones (3, 15) mostraron resistencia a 7 y 8 antibióticos, esto representa un problema desde el punto de vista de salud.

El género *Pseudomonas* fue encontrado con mayor reiteración en las aguas termales Ojo de Fantasma, identificándose 13 clones (31.7%).

El porcentaje de resistencia a antibióticos de los clones aislados en este estudio se presentó principalmente a la ampicilina 31,70%; penicilina 30,94%; amoxicilina / ácido clavulánico 21,95%, gentamicina 14.63%.

RECOMENDACIONES

Las aguas mineromedicinales utilizadas para tratamientos terapéuticos deben tener un estudio constante de control microbiológico, para evitar cualquier riesgo sanitario en la población.

Realizar otros estudios microbiológicos en diferentes estaciones del año para establecer si la microbiota de las aguas termales Ojo de Fantasma puede variar con el cambio estacional.

Promover la creación de una normativa de regulación de la calidad microbiológica de las aguas termales usadas como medicinales y para recreación.

BIBLIOGRAFIA

3M. Placa Petrifilm para Recuento de Hongos y Levaduras [en línea]. Lima-Perú: 2006b
<https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=3&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwiXq>

3M. Placa Petrifilm para Recuento E. coli y Coliformes [en línea]. Lima-Perú: 2006a.
<https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwiXq>

3M España S.A. Análisis de Microorganismos Indicadores [en línea]. 2016.
http://solutions.productos3m.es/wps/portal/3M/es_ES/FoodSafetyEU/FoodSafety/ProductInformation/ProductCatalogue/

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.

Armijo, M; & San Martín, J. Clasificación de las aguas mineromedicinales. En: Curas balnearias y climáticas. Talasoterapia y Helioterapia. 2a Ed. Madrid.España. 1994. pp. 219-223

BectonDickinson. Salmonellashigella[enlínea]2013Disponibleen:<http://www.bd.com/resource.aspx?idx=8779>

Becton Dickinson. Gmbh. Bd macconkey ii agar [en línea]. 2014.
https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=3&cad=rja&uact=8&ved=0ahukewi59pljt5toahwe0h4khfmr9cqfvgvmai&url=http%3a%2f%2fwww.bd.com%2fresource.aspx%253fidx%253d8770&usq=afqjngvdwrc8qrr55-90d6llzig_6ziq&sig2=mifp9lmkmsqzhslyn6ihbghhttp://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/macconkeyagar.htm

Benavides, Cinthya., Pruebas Bioquímicas, " Análisis Microbiológico de las Aguas Termales en la Comunidad Cunuyacu ubicado en la Parroquia Pastocalle Perteneiente a la Provincia de Cotopaxi",2017,pp.36-42 <http://dspace.epoch.edu.ec/bitstream/123456789/6335/1/56T00677.pdf>

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

Bravo L, et al. Caracterización fenotípica y factores de virulencia en cepas de *Aeromonas* aisladas de pacientes con enfermedad diarreica aguda en Cuba [en línea].] Revista Científica SCIELO Vol. 28, N° 2, 2011. [Consulta: 04 de Agosto del 2016] La Habana, Cuba. pp. 159-165. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182011000200009

Burbano, Napoleón; et al. Becerra. Aguas termominerales en el Ecuador [en línea] Ecuador: 2013. <https://issuu.com/inamhi/docs/termalismo>

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

Castro, Raimudo; et al, *Staphylococcus aureus* meticilino resistente en niños escolares de Cartagena [en línea] Cartagena Colombia, 2 de Mayo del 2010. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/25331/1/22678-78379-1-PB.pdf>

Cenderano, E; Cantón Rafael; Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología [en línea] Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 2010, Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf>

Comunidad Andina, Presentación. [En línea] 2010 http://www.comunidadandina.org/Upload/2011225165237AGUA_DE_LOS_ANDES.pdf.

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

De la Rosa et al. “Microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario “Puente Viego”. Anales de la real academia nacional de farmacia. Vol. 73, (2007), (España) pp. 251-263.

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. [en línea], (Tesis) (Maestría). Universidad de los Andes, Facultad

de Farmacia y Bioanálisis, Mérida-Venezuela. 2013, pp. 5; 39; 161. [Consultado: 29 de Agosto del 2018]. Disponible en: <http://javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis249.pdf>

España. Instituto Geológico y Minero. Composición química de las aguas subterráneas naturales https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwji17jNIPfPAhXCTCYKHRPmDMsQFggeMAA&url=http%3A%2F%2Faguas.igme.es%2Ffigme%2Fpublica%2Flibro43%2Fpdf%2Flib43%2F1_1.pdf&usg=AFQjCNEs0oe49u9LhAv4ULrWi6FcJaNlcg&sig2=SgWuLiYuNS0J13ZaRI8JkQ

España. Real Decreto 742/2013, de 27 de septiembre: Criterios técnicos-sanitarios de la calidad del agua y del aire de las piscinas

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.

GAD Penipe. Catalogo Turistico [en línea]. Riobamba-Ecuador, 2012. Disponible en: <http://www.penipe.gob.ec/web/turismo/lugares-quevisitar/catalogo-turistico>

Granados Pérez, Raquel; & Villaverde Peris, Ma Carmen. Microbiología. Bacteriología. Medios de cultivo y pruebas bioquímicas. Micología general. Parasitología general. Tomo II. 2ª ed. Australia: Thomson Paraninfo, 2003, pp. 6-151

Grebo. Secretaria manual de actualizacion en resistencia bacteriana y normas CLSI M100 - S20.2010. pp. 1-78.

Gualpa, Susana., Antibiograma., “Estudio Microbiológico de las Aguas Termales del Balneario Cununyacu ubicado en las Faldas Noroccidentales del Cerro Ilaló de la Parroquia Tumbaco Perteneciente a la Provincia de Pichincha”., 2016, pp. 75-79 <http://dspace.espace.edu.ec/bitstream/123456789/6335/1/56T00677.pdf>

Guaila Rolando, (2015). Estabilización de clones Estudio microbiológico de los manantiales termales del balneario “Urauco” ubicado en la parroquia Lloa perteneciente a la provincia de

Pichincha. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba., pp.. 45-67.,
<http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/4440>

Herrera, F. Fundamentos de epidemiología: el arte detectivesco de la investigación epidemiológica, [en línea]. España. Hospital Nacional de Niños de España, 1994, pp. 10-20. [Consulta: 11 mayo 2018]. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=vu7xOb6X_qkC&printsec=frontcover&hl=es&source=gs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false

High Leifson O.F. Oxidación-fermentación (prueba de Hugh y Leifson) 2011 Disponible en: http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/leifson.pdf.

Instituto Ecuatoriano de Normalización. Aguas. Minerales. Aguas. Minerales Naturales Fecha de confirmación 2012-10-29., [en línea]. Quito-Ecuador., 2012., p. 8. Disponible en: <https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.2178.2011.pdf>

Juliet, V. Bacterias [en línea]. Argentina. LIGA, 2012, pp.23-30. [Consulta: 18 abril 2018]. Disponible en: <https://biologicaliga.wordpress.com/apuntes-teoricos/>

Laboratorios Britania OF medio basal de Hugh & Leifson [en línea]. 2010 Disponible en: http://www.britanialab.com/productos/580_hoja_tecnica_es.pdf

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

López, Tévez., & Torres, Leonor. Medios de Cultivos Microbiología. *Universidad Nacional de Nordeste. Facultad de Agroindustrias. Microbiología.* 2010. vol. 1, pp. 15-20.

Instituto Geológico minero, Historia del Termalismo, [En línea] 2017 <http://aguasmineralesytermales.igme.es/introduccion/aguas-minerales-termales-historia>; Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización". [en línea] 2000. México Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/127ssa14.html>

Muñoz, Carlos, Geosalud, 2018, Las Aguas Termales y sus propiedades curativas, 13 de Agosto, 2018, Mexico, https://www.geosalud.com/aguas_termales/aguas_termales.htm

Restrepo, Mauricio et al. “Artritis reactiva asociada con bacteriemia por *Brevundimonas diminuta*”. [en línea] Revista Colombiana de Reumatología, vol. 17, N° 3, 2010. Medellín-Colombia. pp. 245-248. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rcr/v17n4/v17n4a06.pdf>

Rodríguez, E. (2005). Bacteriología General: Principios y Prácticas de Laboratorio. [en línea]. Costa Rica. Disponible en: http://books.google.com.ec/books?id=vwB0fgirgN0C&pg=PA3&hl=es&source=gbs_to_c_r&cad=3#v=onepage&q&f=false

Salas, Henry. Historia y aplicación de normas microbiológicas de calidad de agua en el medio marino. Water Science Technology. Vol.18 n°11 (2000) (México D.F.-México) pp. 1-2

Zarate, JG., et al. Microbiology of Methanogenesis in Thermal, Volcanic Enviroments. Journal of bacteriology. Vol. 143 n°1 (2003), (Yellowstone- EEUU) pp. 432-440.

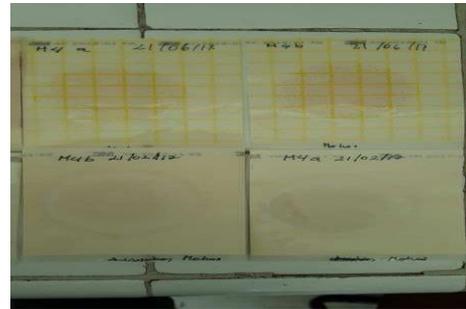
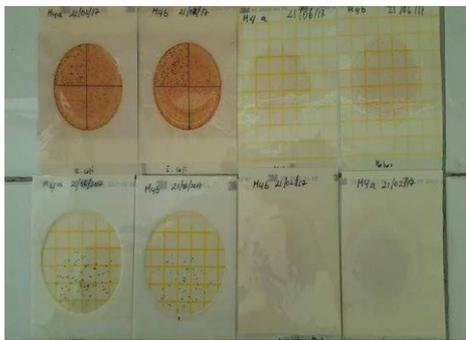
ANEXOS

ANEXO A. Aguas termales “Ojo de Fantasma”

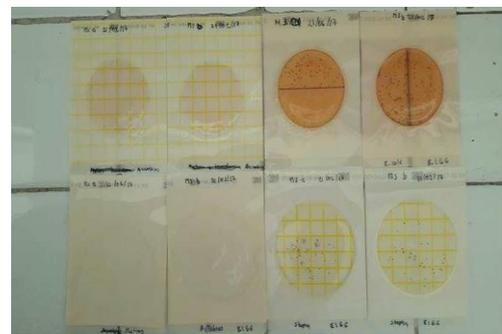


ANEXO B. Placas Petrifilm de *E. coli/ Coliformes*, *Staphylococcus*, *Aerobias Mesofilas*, mohos y levaduras

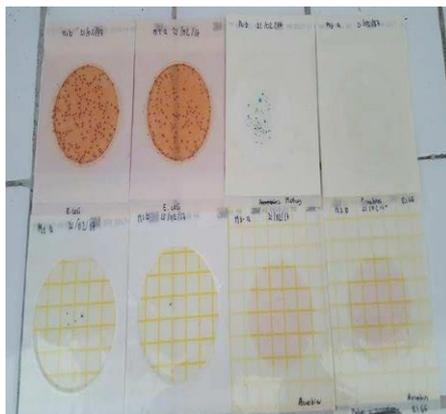
Muestra M1



Muestra M2

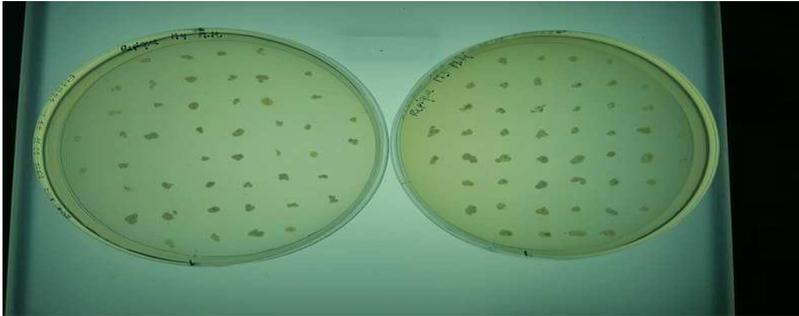


Muestra M3

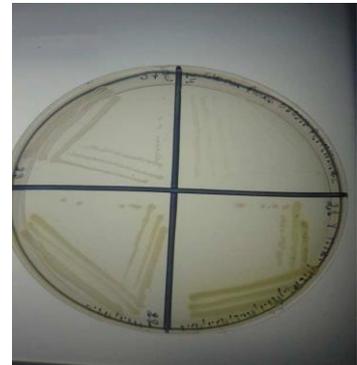
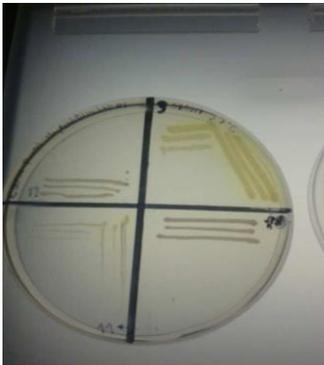


ANEXO C. Repiques de las colonias seleccionadas

Repique 3 y 4 de las colonias



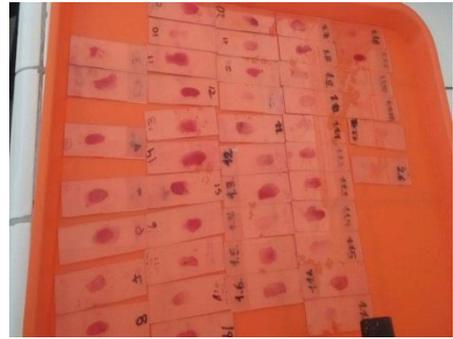
ANEXO D. Siembra y selección de los 41 clones



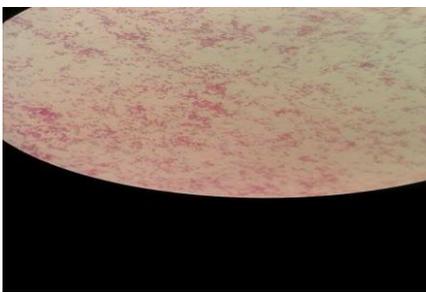
ANEXO E. Siembra y selección de los 41 clones



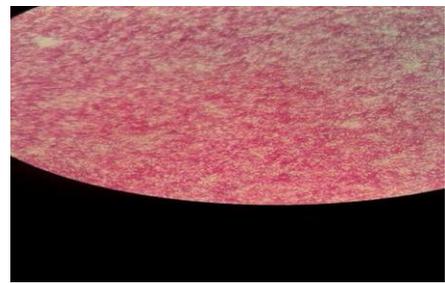
ANEXO F. Tinción Gram de los clones



ANEXO G. Coco Gram Positivo



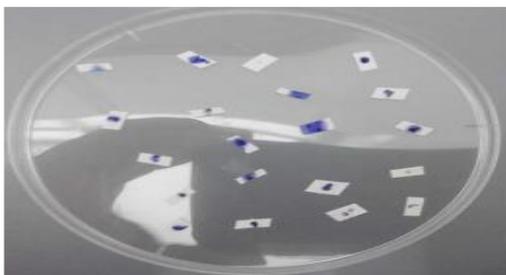
ANEXO H. Bacilo Gram negativo



ANEXO I. Prueba de catalasa



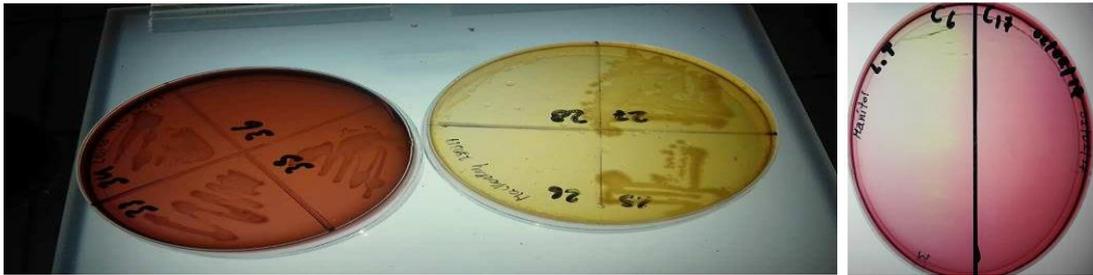
ANEXO J. Prueba de oxidasa



ANEXO K. Pruebas Bioquímicas



ANEXO L. Pruebas confirmatorias Manitol, E.M.B, MacConkey



ANEXO M. Antibiogramas

