



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

**“ESTUDIO MICROBIOLÓGICO DE LAS AGUAS
TERMOMINEROMEDICINALES DEL BALNEARIO “EL
SALADO” DE BAÑOS DE AGUA SANTA-
TUNGURAHUA”**

TRABAJO DE TITULACIÓN

**PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA**

**AUTOR:
SANDRA VANESSA NÚÑEZ ALMEIDA**

RIOBAMBA – ECUADOR

2015

DEDICATORIA

A Dios por brindarme la sabiduría y entendimiento todos los días de mi vida.

A mí tesorito amado, mi hijo Darrellito Ignacio, que es mi inspiración, mi motivo de superación para ser un ejemplo en su camino.

A mi amado esposo José Flores, que me brinda día a día su amor incondicional, comprensión y apoyo durante todo este tiempo. Le amo con todo mi corazón.

A mis padres Blasco Núñez y Carmita Almeida por brindarme todo su amor, sacrificio y apoyo incondicional a lo largo de mi vida.

A mi hermano Blasquito Núñez, por ser un ejemplo a seguir de lucha y perseverancia por conseguir todo lo anhelado.

Vanessa.

AGRADECIMIENTO

A Dios por darme la vida y estar junto a mí en todo momento enviándome bendiciones, por no dejarme caer en los momentos más difíciles y por permitirme culminar mi carrera profesional.

A mis padres por siempre estar dispuestos a darme su apoyo incondicional y velar cada decisión tomada; este logro se los debo a ustedes papitos queridos.

A mi esposo, José Ignacio Flores por su amor, comprensión y alentarme con sabios consejos en los momentos más oportunos.

Al excelente grupo de facilitadores, de manera especial a la Dra. Sandra Escobar directora de tesis y al Dr. Gerardo Medina colaborador de la misma, mi más sincero agradecimiento por brindarme su colaboración, conocimientos y experiencia siendo esencial para la culminación de esta investigación. .

Al Dr. Félix Andueza por dedicar su tiempo, conocimientos, asesoramiento y experiencia en todo momento, para la ejecución de esta investigación.

A las Doctoras Aidita, Paty, Chavelita, demás familiares y a mis amigas en especial a Patty Macas que de una u otra forman colaboraron para la realización de este proyecto.

Vanessa.

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

El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que: El trabajo de investigación: **“ESTUDIO MICROBIOLÓGICO DE LAS AGUAS TERMOMINEROMEDICINALES DEL BALNEARIO “EL SALADO” DE BAÑOS DE AGUA SANTA-TUNGURAHUA**”, de responsabilidad de la egresada Sandra Vanessa Núñez Almeida, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Titulación, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Dra. Sandra Escobar
**DIRECTORA DEL
TRABAJO DE
TITULACIÓN**

Dr. Gerardo Medina
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

**NOTA DEL TRABAJO
TITULACIÓN**

HOJA DE RESPONSABILIDAD

Yo, **Sandra Vanessa Núñez Almeida**, 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.

SANDRA VANESSA NÚÑEZ ALMEIDA

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ÍNDICE DE CUADROS

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE GRÁFICOS

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE ANEXOS

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

CAPÍTULO I

1	MARCO TEÓRICO	1
1.1	Termalismo.....	1
1.1.1	Conceptos.....	1
1.1.2	Historia.....	2
1.1.3	Cura Balnearia.....	3
1.2	Aguas Termales.....	4
1.2.1	Concepto de Aguas Termales	4
1.2.2	Ubicación de las Termas.....	4
1.2.3	Clasificación de las Aguas Termominerales.....	5
1.2.3.1	Clasificación Geológica-Genética.....	5
1.2.3.2	Clasificación en relación a la temperatura.....	5
1.2.3.3	Clasificación por su composición química.....	6
1.2.3.4	Clasificación según la composición química y las acciones terapéuticas.....	7
1.2.3.5	Clasificación por su salinidad.....	7
1.2.3.6	Clasificación según la tonacidad.....	8
1.2.3.7	Clasificación en relación al pH.....	9
1.2.4	Vías y Técnicas de Administración de las Aguas Mineromedicinales.....	9
1.2.5	Beneficios de las Aguas Termo-Mineromedicinales.....	9
1.3	Microorganismos presentes en las Aguas Termales	10

1.3.1	Microorganismos Autóctonos.....	11
1.3.2	Microorganismos Alóctonos	11
1.3.2.1	Aerobios.....	12
1.3.2.2	Coliformes.....	12
1.3.2.3	Los hongos.....	14
1.4	Métodos de Identificación de Carga Microbiana en Agua.....	14
1.4.1	Placas Petrifilm.....	15
1.4.2	Medios de Cultivo.....	16
1.4.2.1	Agar Mueller –Hinton.....	16
1.4.2.2	Agar Almidón.....	16
1.4.2.3	Agar Gelatina.....	16
1.4.2.4	Agar F (medio King B)	16
1.4.2.5	Agar Manitol Salado.....	17
1.4.2.6	Agar con eosina y azul de metileno.....	17
1.4.2.7	Agar MacConkey.....	17
1.4.2.8	Agar Salmonella-Shigella.....	17
1.4.2.9	Agar Hugh-Leifson (OF)	17
1.4.2.10	Agar de Hierro de Kligler.....	18
1.4.2.11	Medio SIM.....	18
1.4.2.12	Agar Urea.....	18
1.4.2.13	Agar Citrato Simons.....	18
1.4.3	Descripción macroscópica.....	18
1.4.4	Tinción Diferencial de Gram.....	19
1.4.5	Pruebas Bioquímicas Individuales para la identificación de bacterias.....	19
1.4.5.1	Prueba de catalasa.....	19
1.4.5.2	Prueba de oxidasa.....	20
1.4.5.3	Prueba de hidrolisis de la gelatina.....	20
1.4.5.4	Prueba de hidrolisis del almidón.....	20

1.4.5.5	Prueba de oxidación-fermentación.....	20
1.4.5.6	Prueba de movilidad.....	20
1.4.7	Antibiograma.....	21
1.5	Termales de “El Salado”.....	21
1.6.1	Ubicación.....	21
1.6.2	Descripción.....	22

CAPÍTULO II

2	PARTE EXPERIMENTAL.....	25
2.1	Lugar de Investigación.....	25
2.2	Factores de Estudio.....	25
2.2.1	Población.....	25
2.2.2	Toma de muestra.....	25
2.3	Materiales, Equipos y Reactivos.....	26
2.4	Métodos y Técnicas.....	27
2.4.1	Muestreo.....	28
2.4.1.1	Captación en el Ojo de Agua.....	28
2.4.1.2	Captación de un Tanque de Almacenamiento (Piscina).....	28
2.4.1.3	Identificación y Conservación de las Muestras.....	28
2.4.2	Determinación del Análisis Físico-Químico (Multiparámetro de HANNA).....	29
2.4.3	Método para determinación de carga bacteriana.....	29
2.4.3.1	Petrifilm siembra en placas.....	29
2.4.3.2	Estabilización del aislado bacteriano.....	30
2.4.3.3	Tinción Gram.....	31
2.4.3.4	Prueba de catalasa para colonias bacterianas aisladas.....	32
2.4.3.5	Pruebas de oxidasa para colonias bacterianas aisladas.....	32
2.4.3.6	Investigación de Bacilos Gram Positivos.....	32
2.4.3.7	Investigación de Cocos Gram Positivos.....	34

2.4.3.8	Investigación de Bacilos Gram Negativos.....	34
2.4.3.9	Pruebas Bioquímicas.....	36
2.4.3.10	Identificación taxonómica de las colonias aisladas.....	37
2.4.4	Antibiograma.....	39
2.4.5	Flujogramas de identificación de especies y géneros.....	39

CAPÍTULO III

3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	53
3.1	Propiedades físico-químicas del Balneario “El Salado” de Baños de Agua Santa-Tungurahua.	53
3.2	Aerobios Mesófilos Totales.....	54
3.3	<i>Escherichia coli</i> y Coliformes Totales.....	57
3.4	Staph Express (<i>Staphylococcus aureus</i>).....	61
3.5	Mohos y Levaduras	65
3.6	Bacterias Gram Positivas y Gram Negativas del Balneario “El Salado”	68
3.7	Identificación de bacterias mesófilas bacilos Gram negativos.....	72
3.8	Identificación de bacterias mesófilas bacilos Gram positivos.....	75
3.9	Identificación de bacterias mesófilas cocos Gram positivos.....	77
3.10	Cepas aisladas en el Balneario “El Salado” de Baños de Agua Santa-Tungurahua.....	79
3.11	Antibiogramas de bacilos Gram negativos.....	81
3.12	Antibiogramas de bacilos Gram negativos <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	83
3.13	Antibiograma de bacilos Gram positivos.....	85
3.14	Antibiograma de cocos Gram positivos.....	86
3.15	Antibiograma de cocos Gram positivos (<i>Staphylococcus aureus</i>)	86
	CONCLUSIONES.....	88
	RECOMENDACIONES.....	90
	BIBLIOGRAFÍA	
	ANEXOS	

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

%	Porcentaje
m.s.n.m.	Metros sobre el nivel del mar
°C	Grados Celsius
mg/l	Miligramos por litro
<i>et al</i>	y colaboradores
mL	Mililitro
mm	Milímetro
meq/L	Miliequivalentes por litro
UFC/mL	Unidades formadoras de colonias por mililitro
AOAC	ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS
AFNOR	ASOCIACION FRANCESA DE NORMALIZACIÓN
NCIMS	U.S. GRADE A PASTEURIZED MILK ORDINANCE
g/L	Gramos por litro
mmol/L	Mili mol por litro
O/F	Oxidación-Fermentación de la glucosa
UTM	Universal Transversa Mercator
μS/cm	Microsiemens por centímetro
p.s.i	pounds-force per square inch
μg	Microgramos
UI/mL	Unidad internacional por mililitro
ppm	Partes por millón

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1-1	Clasificación según la composición química.....	6
Cuadro 2-1	Propiedades terapéuticas de diferentes tipos de Aguas según la composición.....	7
Cuadro 3-1	Grupos de Aguas y sus características.....	7
Cuadro 1-2	Materiales de Laboratorio.....	26
Cuadro 2-2	Equipos.....	26
Cuadro 3-2	Reactivos.....	27
Cuadro 4-2	Medios de Cultivo.....	27

ÍNDICE DE FIGURA

Figura 1-1	Clasificación según Souline.....	6
Figura 2-1	Mapa de ubicación del Balneario “El Salado” (Baños de Agua Santa - Tungurahua).....	22
Figura 3-1	Balneario “El Salado” en el cantón Baños de Agua Santa-Tungurahua.....	23
Figura 1-2	Siembra en Placas 3M™ Petrifilm™.....	30
Figura 2-2	Identificación general de bacterias aisladas en el ojo de agua.....	40
Figura 3-2	Identificación de bacterias aisladas en la Piscina. (A).....	41
Figura 3-2	Identificación de bacterias aisladas en la Piscina. (B).....	42
Figura 3-2	Identificación de bacterias aisladas en la Piscina. (C).....	44
Figura 5-2	Identificación de <i>Staphylococcus spp.</i>	45
Figura 6-2	Identificación de <i>Staphylococcus aureus</i>	46
Figura 7-2	Identificación de <i>Citrobacter freundii</i>	47
Figura 8-2	Identificación de <i>Enterobacter gergovia</i>	48
Figura 9-2	Identificación de <i>Budvicia aquatica</i>	49
Figura 10-2	Identificación de <i>Cedecea davisae</i>	50
Figura 11-2	Identificación de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	51
Figura 12-2	Identificación de <i>Edwardsiella ictaluri</i>	52

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-3	Recuento de Aerobios Mesófilos Totales del Balneario “El Salado”.....	55
Gráfico 2-3	Recuento de <i>Escherichia coli</i> y Coliformes Totales del Balneario “El Salado”	58
Gráfico 3-3	Recuento de <i>Staphylococcus</i> del Balneario “El Salado”	62
Gráfico 4-3	Recuento de Mohos y Levaduras del Balneario “El Salado”	66
Gráfico 5-3	Bacterias Gram Positivas, Gram Negativas y sus tipos morfológicos.....	68

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1	Clasificación según la temperatura.....	5
Tabla 2-1	Clasificación según la salinidad.....	8
Tabla 3-1	Clasificación según Karakolev.....	8
Tabla 4-1	Clasificación según Armijo-Valenzuela y San Martín.....	8
Tabla 5-1	Clasificación según la Norma Cubana.....	9
Tabla 6-1	Balance iónico de aguas termales del Balneario " El Salado".....	24
Tabla 1-3	Constantes físico químicas.....	53
Tabla 2-3	Recuento de Aerobios Mesófilos Totales (ufc/ml).....	54
Tabla 3-3	Recuento de <i>Escherichia coli</i> y Coliformes Totales (ufc/ml).....	57
Tabla 4-3	Recuento de bacterias del genero <i>Staphylococcus</i> (ufc/ml).....	61
Tabla 5-3	Recuento de mohos y levaduras (ufc/ml).....	65
Tabla 6-3	Resultados de la Tinción Gram de Cepas aisladas.....	68
Tabla 7-3	Características culturales, fisiológicas y bioquímicas de las colonias aisladas (bacilos Gram negativos).....	72
Tabla 8-3	Características culturales, fisiológicas y bioquímicas de las colonias aisladas bacilos Gram positivos.....	75
Tabla 9-3	Resultados de Cepas aisladas Cocos Gram positivos.....	77
Tabla 10-3	Géneros y especies de Cepas aisladas en el Ojo de agua y en la Piscina.....	79
Tabla 11-3	Antibiograma de varias especies de <i>Enterobacteriaceae</i>	81
Tabla 12-3	Antibiograma de especies de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	83
Tabla 13-3	Antibiograma de algunas especies de <i>Bacillus spp.</i>	85
Tabla 14-3	Antibiograma de especies de <i>Staphylococcus spp.</i>	86
Tabla 15-3	Antibiograma de especies de <i>Staphylococcus aureus</i>	86
Tabla 16-3	Resultados de la prueba de detección de fenotipos de resistencia en bacterias aisladas en el Balneario “El Salado”.....	87

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A	Análisis Físico-Químico del Agua del Balneario “El Salado”
ANEXO B	Toma de Muestra para examen microbiológico
ANEXO C	Determinación de parámetros con Multiparámetro de HANNA
ANEXO D	Preparación de medio de cultivo Mueller-Hinton y esterilización de materiales
ANEXO E	Siembra en Placa Petrifilm de muestra de Ojo de Agua y Piscina
ANEXO F	Resultado del Recuento de Bacterias del Ojo de Agua después de 48 horas de incubación a 37 °C
ANEXO G	Resultado del Recuento de Bacterias de la Piscina después de 48 horas de incubación a 37°C
ANEXO H	Colonias escogidas para Repiques del Ojo de Agua y de la Piscina
ANEXO I	Resultado de Repiques del Ojo de Agua
ANEXO J	Resultado de Repiques de la Piscina Muestra 1
ANEXO K	Resultado de Repiques de la Piscina Muestra 2
ANEXO L	Estrías de colonias del Ojo de Agua y Piscina
ANEXO M	Clones Puros
ANEXO N	Tinción Gram de Clones Puros del Ojo de Agua y de Piscina
ANEXO O	Prueba de Catalasa y Oxidasa a Clones Puros.
ANEXO P	Investigación de Bacilos Gram Positivos
ANEXO Q	Investigación de Cocos Gram Positivos
ANEXO R	Investigación de Bacilos Gram Negativos
ANEXO S	Pruebas Bioquímicas de Bacilos Gram Negativos
ANEXO T	Antibiogramas de algunas cepas aisladas

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía 1	Información del Análisis Físico-Químico del agua termal.
Fotografía 2	Muestra del Ojo de Agua
Fotografía 3	Muestra del piscina termal
Fotografía 4	Determinación de parámetros físicos y químicos en el ojo de agua
Fotografía 5	Determinación de parámetros físicos y químicos en la piscina
Fotografía 6	Limpieza de Cámara de Flujo
Fotografía 7	Mueller-Hinton Agar
Fotografía 8	Esterilización de Puntas azules, puntas amarillas, palillos.
Fotografía 9	Siembra en Petrifilm para conteo de <i>E.coli</i> /Coliformes
Fotografía 10	Siembra en Petrifilm para conteo de Staph Express
Fotografía 11	Siembra en Petrifilm para conteo de Aerobios Totales
Fotografía 12	Siembra en Petrifilm para conteo de Mohos y Levaduras
Fotografía 13	Placas Petrifilm sembradas y lista para ser incubadas a 37 °C
Fotografía 14	Placas de recuento de Aerobios Totales, Muestra 1 y Muestra 2
Fotografía 15	Placas de recuento de <i>E.coli</i> /Coliformes, Muestra 1 y Muestra 2
Fotografía 16	Placas de recuento de Staph Express, Muestra 1 y Muestra 2
Fotografía 17	Placas de recuento de Mohos y Levaduras, Muestra 1 y Muestra 2
Fotografía 18	Placas de recuento de Aerobios Totales, Muestra 1 y Muestra 2
Fotografía 19	Placas de recuento de <i>E.coli</i> /Coliformes, Muestra 1 y Muestra 2
Fotografía 20	Placas de recuento de Staph Express, Muestra 1 y Muestra 2
Fotografía 21	Placas de Staph Expres con Disco para STX en Muestra 2
Fotografía 22	Placas de recuento de Mohos y Levaduras, Muestra 1 y Muestra 2
Fotografía 23	Placas de Staph Express y Aerobios Totales escogidas para Repiques
Fotografía 24	Placas de <i>E.coli</i> y Aerobios Totales escogidas para Repiques
Fotografía 25	REPIQUE 1
Fotografía 26	REPIQUE 2
Fotografía 27	REPIQUE 3
Fotografía 28	REPIQUE 4
Fotografía 29	REPIQUE 1
Fotografía 30	REPIQUE 2

Fotografía 31	REPIQUE 3
Fotografía 32	REPIQUE 4
Fotografía 33	REPIQUE 1
Fotografía 34	REPIQUE 2
Fotografía 35	REPIQUE 3
Fotografía 36	REPIQUE 4-Reducción de colonias parecidas, colonias
Fotografía 37	REPIQUE 5-Colonias 1-13 (Parte superior)
Fotografía 38	Estrías de colonias de Ojo de Agua 5-30
Fotografía 39	Estrías de colonias de la Piscina Muestra 1 (1-13)
Fotografía 40	Estrías de colonias de la Piscina Muestra 1 (15-29)
Fotografía 41	Estrías de colonias de la Piscina Muestra 2 (16-26)
Fotografía 42	Estrías de colonias de Muestra 2 (<i>Pseudomonas</i>)
Fotografía 43	Clones Puros de Ojo de Agua
Fotografía 44	Clones Puros de la Piscina, Muestra 1 y Muestra 2
Fotografía 45	Clones puros de <i>Pseudomonas</i>
Fotografía 46	Placas para Tinción Gram del Ojo de Agua y de la Piscina
Fotografía 47	Bacilos Gram positivos del Ojo de Agua
Fotografía 48	Cocos Gram positivos del Ojo de Agua
Fotografía 49	Bacilos Gram negativos de la Piscina, Muestra 1
Fotografía 50	Cocos Gram positivos de la Piscina, Muestra 1
Fotografía 51	Bacilos Gram negativos de la Piscina, Muestra 2
Fotografía 52	Cocos Gram positivos de la Piscina, Muestra 2
Fotografía 53	Prueba de Catalasa y Oxidasa
Fotografía 54	Prueba positiva para Almidón y Gelatina (formación de halo)
Fotografía 55	Fermentación de <i>Staphylococcus aureus</i> en Agar Manitol Salado
Fotografía 56	Crecimiento de <i>Staphylococcus spp</i> en Agar Manitol Salado
Fotografía 57	Crecimiento de colonias en Agar Eosina Azul de Metileno
Fotografía 58	Crecimiento de colonias en Agar MacConkey
Fotografía 59	Resultados en Agar OF
Fotografía 60	Resultados de Agar Movilidad
Fotografía 61	Crecimiento de colonias en Agar Salmonella-Shigella
Fotografía 62	Crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosas</i> en Agar F (medio King B)
Fotografía 63	<i>Citrobacter freundii</i>
Fotografía 64	<i>Enterobacter gergoviae</i>

Fotografía 65	<i>Budvicia aquatica</i>
Fotografía 66	<i>Cedecea davisae</i>
Fotografía 67	<i>Shewanella putrefaciens</i>
Fotografía 68	<i>Edwardsiella ictaluri</i>
Fotografía 69	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Fotografía70	<i>Enterobacter gergoviae</i>
Fotografía 71	<i>Staphylococcus spp</i>
Fotografía 72	<i>Staphylococcus aureus</i>
Fotografía 73	<i>Bacillus spp</i>
Fotografía 74	<i>Citrobacter freundii</i>
Fotografía 75	Fenotipos de resistencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Fotografía 76	Fenotipos de resistencia de <i>Citrobacter freundii</i>
Fotografía 77	Fenotipos de resistencia de <i>Budvicia aquatica</i>
Fotografía 78	Fenotipos de resistencia de <i>Shewanella putrefaciens</i>

RESUMEN

Se realizó el estudio microbiológico de las aguas termomineromedicinales del Balneario “El Salado” de Baños de Agua Santa-Tungurahua, La investigación se efectuó en el Laboratorio de Análisis Bioquímico y Bacteriológico de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Con la finalidad de cuantificar y caracterizar bacterias aerobias mesófilas, indicadores fecales, bacterias patógenas, mohos, y levaduras, que representen un riesgo para la salud humana.

El método usado para el conteo de microorganismos fue en placas 3M™ Petrifilm™ por siembra directa de 1 mL de agua termal del ojo de agua y de la piscina, recomendado por la AOAC INTERNACIONAL (2003). Para el aislamiento se realizó repiques en Agar Mueller-Hinton. También se realizó tinción Gram a cada colonia para verificar si son Gram positivos o Gram negativos, de acuerdo a MacFaddin (2003). Por otro lado se realizó pruebas bioquímicas, fisiológicas, de cultivo y pruebas de susceptibilidad antimicrobiana a las cepas aisladas, empleando el método de Kirby Bauer de difusión en agar.

Se aislaron 26 cepas bacterianas, donde el 58% corresponden a bacterias Gram negativas y el 42% a bacterias Gram positivas, predominando los bacilos Gram negativos. Las cepas aisladas e identificadas en el ojo de agua fueron *Bacillus spp* y *Staphylococcus spp*, de igual manera en la piscina se aislaron e identificaron especies como *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter gergoviae*, *Budvicia aquatica*, *Cedecea davisae*, *Shewanella putrefaciens*, *Edwardsiella ictaluri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus spp* y *Staphylococcus aureus*.

Por lo tanto las aguas termales del Balneario El Salado presenta una gran diversidad microbiana, constituyendo un riesgo para la salud de los bañistas.

Se recomienda al GAD de Baños realizar estudios de toxicidad de estas aguas termales, mediante vinculación de estudiantes de la Carrera de Bioquímica y Farmacia.

PALABRAS CLAVE: <BALNEARIO EL SALADO> <AGUAS SULFURADAS MAGNÉSICAS>
<AGUAS HIPERTERMALES> <MICROBIOTA AUTÓCTONA> <MICROORGANISMOS MESÓFILOS> <COLONIAS PURAS> <ANTIBIOGRAMA> <BACTERIAS PATÓGENAS>
< PLACAS PETRIFILM>

ABSTRACT

It was conducted Microbiological study of thermo mineral medicinal waters of Spa “El Salado” of Baños de Agua Santa-Tungurahua. The research was made at the Laboratory of Biochemical and bacteriological analysis of Sciences Faculty of Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. In order to quantify and characterize mesophylic aerobic bacteria, fecal indicators, pathogenic bacteria, moulds and yeasts, which represent a risk to human health.

The method used for counting microorganisms was on 3M™ Petrifilm™ plates by direct seeding, 1 mL of thermal water of the water hole and swimming pool, recommended by the AOAC INTERNATIONAL (2003). For isolation chimes was made in Agar Mueller –Hinton.

Gram stain was also carried out each colony to verify if they are Gram positive or Gram negative, according to MacFaddin (2003). Furthermore, it was performed biochemical test physiological of crops and antimicrobial susceptibility testing to isolated strains using the method of Kirby Bauer agar diffusion.

They were isolated 26 bacterial strains, where 58% were Gram negative bacteria and 42% Gram positive bacteria, Gram negative bacilli predominate. Stains isolated and identified in the waterhole were *Bacillus spp* and *Staphylococcus spp*. Similarly in the pool were isolated and identified species as *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter gergoviae*, *Budvicia aquatica*, *Cedecea davisae*, *Shewanella putrefaciens*, *Edwardsiella ictaluri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus spp* y *Staphylococcus aureus*.

Therefore the hot springs of Spa “El Salado” has a great microbial diversity, constituting a risk to bathers' health. It is recommended to GAD Baños make toxicity studies of these thermal waters through linking students of the School of Biochemistry and Pharmacy.

KEYWORDS: <SPA EL SALADO> <SULPHURED MAGNESIUM WATERS>
<HYPERTHERMAL WATERS> <AUTOCHTHONOUS MICROBIOTA> <MESOPHILIC MICROORGANISMS> < PURE COLONY> <ANTIBIOGRAM> < PATHOGENIC BACTERIA>
< PETRIFILM PLATES>

INTRODUCCIÓN

Ecuador está ubicado en el Círculo de Fuego del Pacífico, está atravesado por varias cadenas montañosas en las que se destacan al menos una decena de volcanes, unos cuantos de ellos activos y a poca distancia unos de otros, relacionadas a sistemas de fallas y fisuras, haciendo que las aguas fluyan desde el interior hacia la superficie en forma de manantiales, con temperaturas elevadas y alto grado de mineralización, por esta razón nuestro país es privilegiado por la riqueza en termas de toda clase, especialmente en las regiones andina e interandina. **(WOLF, 2013).**

En el Ecuador a las fuentes termo-mineromedicinales se les adjudican, desde tiempos antiguos propiedades curativas, relajantes según el misticismo y la leyenda. Hoy en día son lugares turísticos, recreativos y balneológicos, su uso como medicamento es casi nulo, excluyendo valiosos remedios que ofrecen ciertas aguas minerales para tratamientos de algunas enfermedades. Los médicos, no las conocen, dejan su aplicación a personas creyentes de los beneficios curativos de estas aguas por efecto mágico y religioso. **(DE LA ROSA, MC. y MOSSO, MA., 2004)**

Ecuador, no cuenta con estudios microbiológicos de ecosistemas acuáticos en especial de aguas termales, únicamente el INAMHI mediante el Grupo de Estudio Hidrogeológicos presentó un inventario y monitoreo de fuentes termo minerales del Ecuador, enfocándose en las características físico-químicas y composición iónica. **(INAMHI., 2013)**

Al Balneario “El Salado” desde tiempos remotos los turistas acuden para realizarse tratamientos terapéuticos en estas termas, beneficiándose aproximadamente 15000 personas de la zona 3 conformada por: Cotopaxi, Chimborazo, Pastaza, Tungurahua, a más de visitantes nacionales y extranjeros que afluyen y radican esporádicamente en este cantón por el turismo y sanación que brinda esta terma. **(VIAJANDOX.COM., 2014)**

A este balneario acuden por semana aproximadamente 900 bañistas y en feriados este número aumenta de 2000 a 3000 visitantes, con este número significativo de personas que se benefician de estas aguas fue relevante realizar esta investigación para ofrecer información fehaciente y objetiva de la calidad de agua que está disponible para todos los usuarios, al conocer parámetros microbiológicos que se mantengan en los rangos establecidos en normas internacionales, logrando minimizar efectos adversos sobre la salud y el medio ambiente pudiendo así garantizar los derechos de la naturaleza y promover la sostenibilidad ambiental territorial y global como lo describe el objetivo 3 del Plan Nacional del Buen Vivir. **(ALVAREZ, M., et al. 1995)**

Al no existir estudios microbiológicos previos de aguas termales en Ecuador, esta fue una investigación pionera para resaltar recursos hídricos y microbiológicos presentes en esta fuente que hasta hoy en nuestro país no son investigados.

El estudio del control de calidad de las aguas termales en el Balneario “El Salado”, se basó en parámetros higiénico-sanitarios, mediante identificaciones de contaminaciones originadas por microorganismos para impedir o reducir contagios en los usuarios. Los microorganismos son indicadores de la calidad sanitaria del agua, por lo tanto, cada balneario posee una calidad única, presentando sus propiedades y por ende sus aplicaciones, para aumentar el bienestar y mejorar la calidad de vida de la población.

Es por ello que esta investigación se estableció como objetivo principal la caracterización de la microbiota nativa presente en las aguas termominerales del Balneario “El Salado” ubicado en el Cantón Baños de Agua Santa, perteneciente a la provincia de Tungurahua.

En esta investigación de igual forma se cuantificaron bacterias heterótrofas aerobias mesófilas, *Staphylococcus aureus*, coliformes totales, coliformes fecales, mohos y levaduras mediante el método de Placas 3M™ Petrifilm™, sembrando las bacterias en varios agares selectivos y diferenciales para la obtención de cultivos puros. A las colonias aisladas se les realizaron pruebas fisiológicas, bioquímicas para determinar la identificación de las principales especies bacterianas presentes. (MACFADDIN, J. 2003).

Como un aporte a lo científico se realizó pruebas de resistencia y sensibilidad de varias cepas bacterianas aisladas e identificadas de acuerdo a la metodología de Kirby Bauer de difusión en disco. De modo que se podrá determinar fenotipos de resistencia a diferentes antimicrobianos. (ÁLVAREZ et al, 1990)

CAPÍTULO I

1 MARCO TEÓRICO

1.1 Termalismo

1.1.1 *Conceptos*

- **Agua natural:** agua que se capta por perforación de pozo, es un sistema complejo, heterogéneo, formado por una fase acuosa, gaseosa y una o más fases sólidas. (FAGUNDO, J. y GONZÁLEZ, P. 2007).
- **Agua mineral natural:** agua obtenida de fuentes naturales o perforaciones de aguas subterráneas, que se caracteriza por la presencia y proporción de sales minerales y trazas de otros constituyentes necesarios para el metabolismo humano y poseen pureza microbiológica original. (FAGUNDO, J. y GONZÁLEZ, P. 2007).
- **Agua mineral:** agua que se origina en acuíferos subterráneos, que difiere de las demás por presenta un grado de mineralización y son estables en temperatura, caudal, composición química y microflora saprofítica. (FAGUNDO, J. y GONZÁLEZ, P. 2007).
- **Agua mineral termal:** agua mineral, donde la temperatura debe ser superior al menos en 4°C, tomado en cuenta la media anual ambiental del lugar que emerge. (FAGUNDO, J. y GONZÁLEZ, P. 2007).
- **Agua mineromedicinal:** agua que por su constitución de características especiales poseen fines terapéuticos y son de uso público. (HERNÁNDEZ, A., et al. 2006).

- **Agua de manantial:** agua que emerge espontáneamente a la superficie de la Tierra, para ser explotadas, no posee las propiedades del agua mineral. (FAGUNDO, J. y GONZÁLEZ, P. 2007).
- **Balneario:** lugares ideales para iniciar medidas y consejos de prevención, tratamiento y rehabilitación para un mejor estado de salud, y por ende una mejor calidad de vida. (HERNÁNDEZ, A., et al. 2006).
- **Cura balnearia:** es el uso de las aguas mineromedicinales, en el sitio de emergencia, el balneario, siendo este el agente medicamentoso, que está compuesto de factores, tales como: climáticos, higiénico-dietéticos, psíquicos, ejercicio físico y reposo con el fin de prevenir, tratar, recuperar de modo funcional y/o rehabilitar. (HERNÁNDEZ, A., et al. 2006).
- **Hidrología Médica:** es una rama de la Terapéutica, que estudia las características fundamentales de las aguas mineromedicinales con función terapéutica. (HERNÁNDEZ, A., et al. 2006).

1.1.2 Historia

La historia del agua con acción terapéutica hace enaltecer a las antiguas tribus que anidaban en las cavernas, sin ningún conocimiento, solo se basaban en la capacidad de observación que tiene el hombre, de modo que con el paso de los años lograron iniciar una técnica terapéutica que se mantiene hasta la actualidad. (GARCÍA, Á. 2006).

El hombre categorizaba al agua como un elemento sagrado, debido a que observaba que animales heridos al acercarse a manantiales de agua caliente, mejoraban su salud. (GARCÍA, Á. 2006).

En la época Griega, los balnearios eran lugares de peregrinación de enfermos, que recibían tratamientos por sacerdotes mediante la hidroterapia y la fe, la hidroterapia era un método terapéutico de primer orden, donde el agua caliente la usaban para debilitar la musculatura, aliviar dolores y curar heridas, pero un mal uso podría ser dañino para la salud del enfermo. (DÍEZ, F. 1985).

En la época Romana las termas eran públicas, estaban presentes en todas las ciudades y buscan en las aguas el equilibrio del cuerpo que esta alterado por las enfermedades siendo los más habituales dolores reumáticos. (DÍEZ, F. 1985).

En la edad Media la hidroterapia se despliega en forma de baños, bebidas y aplicación directa en quemaduras, sucede un retroceso, donde los conocimientos aprendidos se engloban en monasterios y se deja de lado. **(DÍEZ, F. 1985).**

En el siglo XV e inicios del siglo XVI gracias al invento de la imprenta Juan Miguel Sanonarola publica el primer tratado de termalismo y balneoterapia denominado *De Balneis et Thermics* y Andrea Badius publicó el libro *De Termis* el mismo que contiene características y efectos de las aguas medicinales. **(DE LA ROSA, MC. y MOSSO, MC. 2004).**

Luego en los siglos XVII y XVIII se da un gran impulso a la hidroterapia gracias a la acción destacada de los médicos Ovelgun y Hoffmann, además la hidroterapia no era un método preventivo sino un tratamiento terapéutico de varias enfermedades. **(FAGUNDO, J. y GONZÁLEZ, P. 2007).**

En el siglo XIX se da un retroceso debido a que los médicos buscan otras alternativas para curar las patologías, pero Priessnitz usó la este tratamiento para curarse y curar a los enfermos. Kneipp también aportó a la hidroterapia mediante la creación de una técnica fundada con agua fría y chorros totales o parciales que eliminaban sustancias nocivas o patógenas. **(FAGUNDO, J. y GONZÁLEZ, P. 2007).**

En el siglo XXI la Hidrología Médica tiene su magnificencia donde se relacionan aspectos sociales y científicos, mediante la adición de estudios de la composición de las aguas minerales, sus acciones sobre órganos y funciones en cuerpos sanos y enfermos. **(HERNÁNDEZ, A., et al. 2006).**

La terapia balnearia sigue siendo un proceder terapéutico y factor coadyuvante en el tratamiento de distintos procesos anómalos, y de importancia trascendente en la Prevención, Tratamiento y Rehabilitación de cuadros patológicos que puede proveer la recuperación en muchos enfermos. **(HERNÁNDEZ, A., et al. 2006).**

1.1.3 Cura Balnearia

La Cura Balnearia bien implantada y controlada ocasiona una respuesta favorable a la mayoría de alteraciones, primordialmente del aparato locomotor, digestivo, respiratorio, circulatorio, gñjafecciones dérmicas, etc., alteraciones en las que interceden con frecuencia factores psicossomáticos y/o neurovegetativos y que se empeoran con el estrés de la vida moderna.

Por lo que es una terapia específica, irremplazable, que manipula agentes naturales: agua, barros, arcillas, entre otros. Esta terapia es poco ofensiva, bien tolerada, que rara vez provoca efectos secundarios o anormales y que demanda gran parte de la población. . (HERNÁNDEZ, A., et al. 2006).

La práctica de la Cura Balnearia supone siempre un cambio de ambiente, cambio del lugar y de las actividades habituales del sujeto, situándole en una atmósfera distinta pero fácilmente aceptada, ya que, de ordinario, ha sido escogida voluntariamente por él mismo y, por tanto, se somete con gusto al tratamiento balneario, en centros diseñados para la puesta en marcha de medidas y consejos de prevención sanitaria para mejorar el estado de salud y mejor calidad de vida. (HERNÁNDEZ, A., et al. 2006).

Según GARCÍA, Ángela (2006), manifiesta que las aguas mineromedicinales son componentes esenciales para desarrollar una cura balnearia y den ser:

- ⊙ Soluciones naturales.
- ⊙ Dificultosas para reproducir artificialmente.
- ⊙ Dotadas de propiedades esenciales
- ⊙ Inmutables en su composición.
- ⊙ Útiles en procesos terapéuticos
- ⊙ Declaradas de uso público.

1.2 Aguas Termales

1.2.1 Concepto de Aguas Termales

Las aguas termales son aguas minerales que se forman en el seno de capas subterráneas de la Tierra que se hallan a altas temperaturas, que emergen espontáneamente o mediante captado, con una temperatura mayor a 5°C sobre la temperatura media anual del ambiente. (INAMH, 2013).

1.2.2 Ubicación de las Termas

El lugar de surgencia de las aguas termales es de gran importancia, debido a que existe una relación entre ciertas características y propiedades, entre ellos los aspectos geológicos de la zona, con aspectos geográficos, donde el ámbito climático y la accesibilidad serán elementos que anticiparan el asentamiento de un balneario, para ejecutar actividades termales. (PERÉX, M. 1997)

1.2.3 Clasificación de las Aguas Termominerales

Según el INAMHI 2013, las aguas termales y minerales pueden ser clasificadas desde varios puntos:

1.2.3.1 Clasificación Geológica-Genética

White, manifiesta que las aguas subterráneas, por el aspecto geológico-genético se clasifican en:

- **Agua Meteórica:** agua subterránea que en la actualidad forma parte del ciclo hidrológico.
- **Agua Congénita:** no está en contacto con la atmósfera, mediante largos períodos de tiempo.
- **Agua Metamórfica:** agua que está en contacto con rocas durante su metamorfismo.
- **Agua Magmática:** agua que se originó y se encuentra en el interior de los magmas de poca profundidad.
- **Agua Plutónica:** agua que se originó y se encuentra en el interior de los magmas de gran profundidad, probablemente a varios kilómetros. (INAMHI. 2013)

1.2.3.2 Clasificación en relación a la temperatura

La temperatura de estas aguas subterráneas depende de las condiciones climáticas y geotérmicas de la región donde estas se forman. Para esta clasificación se usan los prefijos hipo, orto, meso, eso e hiper, según Schoeller (1962), se debe hacer referencia los grados de temperatura del agua con la temperatura media anual del aire (T_{ma}) o temperatura del suelo (T_s) y de ello se obtiene la siguiente clasificación: (INAMHI. 2013).

Tabla 1-1. Clasificación según la temperatura

Frías	Menos de 20 °C
Hipotermiales	Entre 20 y 30 °C
Termales	Entre 30 y 40 °C
Hipertermales	Más de 40 °C

Fuente. (INAMHI, 2013)
Realizado por: NÚÑEZ, S. 2015.

1.2.3.3 Clasificación por su composición química

Según Kurlov, toma en cuenta los aniones y cationes presentes en el agua, con una presencia superior al 20% meq/L. (INAMHI, 2013)

Cuadro 1-1: Clasificación según la composición química

CON RELACIÓN A LOS ANIONES:	CON RELACIÓN A LOS CATIONES:
a) Bicarbonatadas	1. Cálcidas
b) Sulfatadas	2. Magnésicas
c) Cloruradas	3. Sódicas
d) Bicarbonatadas sulfatadas	4. Cálcidas magnésicas
e) Bicarbonatadas cloruradas	5. Cálcidas sódicas
f) Sulfatadas cloruradas	6. Magnésicas sódicas
g) Sulfatadas cloruradas bicarbonatadas	7. Cálcidas magnésicas sódicas

Fuente. INAMHI, 2013

Realizado por: NÚÑEZ, S. 2015.

Según V. A. Souline (1946), las aguas termominerales de acuerdo a la relación entre la concentración de iones Na^+ , Cl^- , SO_4^- , Mg^{++} , expresada en meq/L, se clasifican de la siguiente manera:

Figura 1-1: Clasificación según Souline

RELACIÓN	CLASIFICACIÓN
$r \frac{\text{Na}^+ - \text{Cl}^-}{\text{SO}_4^-} < 1$	Sulfatada-sódica
$r \frac{\text{Na}^+ - \text{Cl}^-}{\text{SO}_4^-} > 1$	Bicarbonatada-sódica
$r \frac{\text{Cl}^- - \text{Na}^+}{\text{Mg}^{++}} < 1$	Clorurada-magnésica
$r \frac{\text{Cl}^- - \text{Na}^+}{\text{Mg}^{++}} > 1$	Clorurada-cálcica

Fuente: INAMHI, 2013

1.2.3.4 Clasificación según la composición química y las acciones terapéuticas

Cuadro 2-1: Propiedades terapéuticas de diferentes tipos de aguas según la composición

TIPO DE AGUA	ACCIÓN TERAPÉUTICA
Sulfuradas	Antialérgicas, desintoxicantes, antiflogísticas, antirreumáticas.
Cloruradas	Anticatarrales, antiinflamatorias.
Sulfatadas	Colagogas, purgantes.
Cálcicas	Antialérgicas, sedantes, antiinflamatorias.
Ferruginosas	Antianémicas, reconstituyentes.
Radiactivas	Equilibradoras, sedantes.
Oligometálicas	Diuréticas

Fuente: FAGUNDO y GONZÁLEZ. 2000.

Realizado por: NÚÑEZ, S. 2015.

Francia, toma en cuenta características de recursos naturales y clasifica a las Aguas en:

Cuadro 3-1: Grupos de Aguas y sus características

GRUPOS	CARACTERÍSTICAS
Aguas Sulfuradas	Presencia de sulfuro y sulfuro de hidrogeno
Aguas Sulfatadas	El anión sulfato es predominante
Aguas Cloruradas	El anión cloruro es predominante
Aguas Bicarbonatadas	El anión bicarbonato es predominante
Aguas Oligominerales	Son ligeramente mineralizadas (menos de 1 g/l)

Fuente: FAGUNDO y GONZÁLEZ. 2000.

Realizado por: NÚÑEZ, S. 2015.

1.2.3.5 Clasificación por su salinidad

La conductividad eléctrica, es un parámetro que se relaciona con la concentración de sales disueltas en agua, es decir, a los sólidos disueltos totales (TDS). (INAMHI, 2013). Se clasifican según su salinidad en:

Tabla 2-1: Clasificación según la salinidad

STD (mg/L)	CLASIFICACIÓN
0 a 160	Baja Salinidad
160 a 480	Salinidad Media
480 a 1440	Salinidad Alta
Mayor a 1440	Salinidad muy Alta

Fuente. (INAMHI, 2013)

Realizado por: NÚÑEZ, S. 2015.

1.2.3.6 Clasificación según la tonalidad

Según Karakolev, 1987 clasifica a las aguas termales basándose en valores de la presión osmótica o descenso crioscópico, donde la presión osmótica relaciona a la cantidad de iones disueltos en milimoles (concentración molar.), las clasifica en:

Tabla 3-1: Clasificación según Karakolev

Hipotónicas	Concentración < 300 mmol/l
Isotónicas	Concentración = 300 mmol/l
Hipertónicas	Concentración > 300 mmol/l

Fuente: (FAGUNDO, 2007)

Realizado por: NÚÑEZ, S. 2015.

Y según el descenso crioscópico se clasifican en:

Tabla 4-1: Clasificación según Armijo-Valenzuela y San Martín

Hipotónicas	Inferior a -0.55 °C
Isotónicas	Entre -0.55 °C y -0.58 °C
Hipertónicas	Superior a -0.58 °C

Fuente: (FAGUNDO, 2007)

Realizado por: NÚÑEZ, S. 2015.

1.2.3.7 Clasificación en relación al pH

Según la Norma Cubana de Agua Mineral (NC 93-01-218:1995) se clasifican las aguas en:

Tabla 5-1: Clasificación según la Norma Cubana

Ácidas	Con pH menor a 6.8
Neutras	Con pH entre 6.8 y 7.2
Alcalinas	Con pH superior a 7.2

Fuente: (FAGUNDO, 2007)

Realizado por: NÚÑEZ, S. 2015.

1.2.4 Vías y Técnicas de Administración de las Aguas Mineromedicinales

“Las aguas mineromedicinales pueden ser administradas por las más diversas formas, con las técnicas apropiadas según el tipo de agua, afección a tratar, tolerancia e idiosincrasia del sujeto y cualquier otra circunstancia que concurra en cada paciente, por lo que el tratamiento deberá ser individualizado.” (HERNÁNDEZ et al, 2006).

- **Cura en bebida:** método antiguo y sencillo, donde se puede ingerir aguas escasamente mineralizadas (diuréticas) y las bicarbonatadas, carbogaseosas, cloruradas de escasa mineralización, sulfatadas o sulfuradas frías (digestivas).
- **Balneación:** por medio de la inmersión del cuerpo en aguas mineromedicinales.
- **Aplicación con presión:** mediante diferentes duchas o chorros que se distinguen por la forma, presión y temperatura con la que se administran las aguas.
- **Estufas:** este procedimiento emplea crenoterapia de gases, el vapor del agua termal y las nebulizaciones. (INSTITUTO DE SALUD CARLOS III. 2003).

1.2.5 Beneficios de las Aguas Termo-Mineromedicinales

En el 2008, FIOSECCO, N.H afirma: Los beneficios de los tratamientos termales son:

- “En la mayoría de los casos, las aguas termales no se contradicen con las terapias habituales.

- Casi no poseen efectos indeseables.
- Permiten que se reduzca y en algunos casos se eliminen los medicamentos que se ingieren.
- Actúa en enfermedades crónicas, donde es muy difícil encontrar alivio por otros medios.
- No cura totalmente, pero sí detiene procesos dolorosos crónicos.
- Permite su uso para estética y prevención de enfermedades comunes.
- Estimula la circulación periférica.
- Provocan relajación muscular.
- Facilitan la actividad cardiorrespiratoria.
- Producen notable sensación de bienestar.”

1.3 Microorganismos presentes en las Aguas Termales

La hidrosfera aloja gran cuantía de microorganismos que se adaptan y colonizan diversos hábitats acuáticos, según características propias físicas, químicas y microbiológicas, de modo que se confiere un “perfil”, como temperatura, concentración de nutrientes y presencia de elementos químicos. (RODÉS, B. 2000).

Las aguas minerales termales de los balnearios son uno de estos hábitats extremos ya que tienen altas temperaturas y elevadas concentraciones de sales, condiciones desfavorables para la vida de muchos seres vivos. Sin embargo, desde hace tiempo se conoce que estas aguas minerales, como cualquier ambiente acuático natural, poseen una población microbiana autóctona que suele ser característica de cada tipo de agua y que depende de sus propiedades fisicoquímicas (temperatura, pH, sales minerales, nutrientes).

También pueden encontrarse en ellas microorganismos alóctonos, procedentes de otros hábitats (suelo, heces, vegetales), considerados contaminantes pero que coexisten con los anteriores, adaptándose a las condiciones adversas.

Los microorganismos se usan para saber la situación ambiental de un espacio o ecosistema determinado, para generar un equilibrio ambiental, y poder evaluar la calidad del ambiente o recuperar ambientes contaminados, evaluando bacterias heterotróficas y hongos mediante la cantidad como por la presencia de especies indicadoras como por ejemplo: *Escherichia coli*, además los microorganismos de mayor riesgo sanitario: *Salmonella*, *Clostridium perfringens*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Legionella*. (RODÉS, B. 2000).

SAN MARTÍN BACAICOA, Josefina (1992), manifiesta que algunos microorganismos encuentran en el agua de la piscina condiciones óptimas para su desarrollo, para otros, este ambiente no es el propicio pero pueden sobrevivir durante un tiempo suficiente para ocasionar y facilitar la transferencia de enfermedades, siendo las más usuales, infecciones otorrinolaringológicas, gastrointestinales, oftalmológicas y cutáneas.

Otro contagio predominante es la infección por hongos, la misma que es favorecida por el óptimo desarrollo de estos microorganismos en ambientes calientes y húmedos, propagándose por el contacto con las superficies húmedas de los suelos de los pasillos, duchas, vestuarios, etc. (SAN MARTÍN BACAICOA, J. 1992).

1.3.1 Microorganismos Autóctonos

La población microbiana total en los puntos de surgencia de los manantiales pueden ser alta, muchos de estos están inactivos, pero dependiendo de las condiciones adecuadas de nutrientes, especialmente pobres en carbono, la temperatura prolongada de incubación harán que estos microorganismos crezcan mejor. (RODÉS, B. 2000).

Hay bacterias termófilas que crecen a más de 45°C pero la mayoría son mesófilas con temperaturas óptimas a 37°C, que se adaptan a estas condiciones de elevada temperatura. (RODÉS, B. 2000).

De la Rosa y Mosso (2002) manifiestan que: “*Las aguas hipertermales presentan una mayor proporción de bacterias Gram positivas mientras que en las mesotermas predominan los bacilos Gram negativos y los cocos Gram positivos. La elevada temperatura de las aguas hipertermales puede ser la causa de esta diferencia ya que las bacterias Gram positivas son más resistentes al calor. Los principales géneros identificados han sido: Pseudomonas, Bacillus, Micrococcus, Staphylococcus, Enterobacter, Acinetobacter y Arthrobacter.*” (DE LA ROSA, MC. y MOSSO, MA. 2000).

1.3.2 Microorganismos Alóctonos

Las aguas termales basándose en el aspecto sanitario no ostentan bacterias patógenas pero en algunos manantiales se han detectado coliformes y enterococos. (RODÉS, B. 2000).

Puede hallarse microorganismos alóctonos en las aguas termales, debido a una contaminación originaria de capas superiores del suelo, las mismas que pueden llegar al propio acuífero. **(RODÉS, B. 2000).**

1.3.2.1 Aerobios

Este grupo está formado por todas las bacterias, mohos y levaduras aptos para crecer ser cultivado y desarrollarse a 30°C en condiciones establecidas, con una estimación total de la microflora. **(DÍAZ, C. 2008).**

1.3.2.2 Coliformes

Los coliformes totales son bacterias bacilo Gram negativos, oxidasa negativa, que fermentan la lactosa y producen gas a 35-37 °C. Este grupo está conformado por especies bacterianas que poseen características bioquímicas parecidas de e importancia relevante como indicadores de contaminación de agua.

Cuando se lleva a cabo la prueba de coliformes con aguas ambientales, varias especies de los cuatro géneros de enterobacterias: *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Citrobacter*, proporcionan resultados positivos y por lo tanto son los coliformes según esta definición. Sin embargo, la importancia del medio ambiente de estos cuatro géneros es muy diversas

El recuento de coliformes totales no es necesariamente una medida de la contaminación fecal y no poseen ninguna relación a su causa. Los coliformes fecales (o coliformes termotolerantes), fermentan la lactosa a 44,5 °C en un medio con las sales biliares, por lo que la detección debe ejecutarse a 44,5 °C. **(CABRAL, J. 2010).**

CABRAL, Joao (2010) demostró que las *Enterobacteriaceae* incluyen tres grupos de microorganismos con funciones muy diversas en el medio ambiente. Grupo I conforma solo *Escherichia coli*, un indicador bueno y fiable de contaminación fecal, en aguas ambientales, esta bacteria no sobrevive durante largos períodos fuera de este entorno.

Grupo II, abarca algunas especies de *Klebsiella* (*K. pneumoniae* y *K. oxytoca*), *Enterobacter* (*Enterobacter cloacae* subsp. *Cloacae*, *E. aerogenes*) y *Citrobacter* (*C. amalonaticus*, *C. koseri* y *C. freundii*). Estas bacterias habitan en el animal y en el intestino humano, sino también en el medio ambiente, y son de fácil aislamiento del suelo, del agua contaminada y plantas, su presencia en las aguas contaminadas no revela contaminación fecal.

Por último el grupo III, conformado por *Raoultella planticola*, *R. terrigena*, *Enterobacter amnigenus* y *Kluyvera intermedia* (*Enterobacter intermedius*), *Serratia fonticola*, y los géneros *Budvicia*, *Buttiauxella*, *Leclercia*, *Rahnella*, *Yersinia*, y la mayoría de las especies de *Erwinia* y *Pantoea*. Estas bacterias viven en aguas frescas, plantas y pequeños animales, crecen a 4 °C, pero no a los 41 °C, no son indicadores de contaminación fecal, aunque puede ser detectado en la prueba de coliformes totales. (CABRAL, J. 2010).

El grupo de los Coliformes está formado por los géneros siguientes:

Escherichia: pertenece al grupo de las enterobacterias, son oxidasa-negativos, de morfología bacilar, catalasa-positivos que fermentan la lactosa. (CABRAL, J. 2010).

- ***Pseudomonas***: los miembros de esta familia comparten las características de ser bacilos Gram negativos aerobios, oxidasa positiva, son móviles por medio de uno o más flagelos polares, usan la glucosa y otros hidratos de carbono de manera oxidativa. Este género se aísla comúnmente en el suelo y en ambientes naturales con mínimos requerimientos nutricionales. El grupo de las fluorescentes producen un pigmento llamado pioverdina. (TORTORA, G., et al, 2007).
- ***Enterobacter***: es miembro de las *Enterobacteriaceae*, son bacilos móviles, son positivos en agar citrato de Simmons, no producen H₂S. Este género se encuentra formando la flora nativa del intestino. En la actualidad se encuentran causando numerosas infecciones nosocomiales severas en otros órganos y tejidos blandos, como: cistitis, meningitis, pleuresía. (CABRAL, J. 2010).
- ***Citrobacter***: es miembro de la Familia *Enterobacteriaceae*, son bacilos móviles, oxidasa-negativos, catalasa positivos, utilizan el citrato como fuente de carbono. (CABRAL, J. 2010).
- ***Edwardsiella***: son miembro de la familia *Enterobacteriaceae*, son bacilos Gram negativos, presentan alguna similitud con la *Salmonella*, es usual hallarlas en animales, y de estos pasan al hombre, pero eventualmente infectan a humanos. Han sido aisladas de heridas infectadas, de septicemias y ocasionalmente en materia fecal diarreica. Las formas clínicas ocasionalmente causan infección de heridas, meningitis y septicemias. (CABRAL, J. 2010).

- ***Budvicia***: es un grupo de organismos estrechamente relacionados. No están tan estrechamente relacionados con los demás miembros de *Enterobacteriaceae*, pero ellos califican como miembros de esta familia. (MAHON, C., et al. 2015).
- ***Shewanella***: este género la mayoría de las especies se relacionan con hábitats acuáticos y marinos y son patógenos para los peces. (KONEMAN, E., et al. 2015).
- ***Cedeceae***: este género se compone de 5 especies. La mayoría se han recuperado de esputo, sangre y heridas. (MAHON, C., et al. 2015).

1.3.2.3 Los hongos

Los hongos son microorganismos difundidos en el ambiente y representan un progresivo problema en la sociedad actual como organismos contaminantes del agua y como patógenos importantes para la salud humana.

Muchos de los hongos no son perjudiciales, pero se comportan como oportunistas y perturban la salud de las personas produciendo alergias, infecciones y toxicidad. De modo que se las más comunes pueden ser *Aspergillus spp.* (GALICIA, R. y PÉREZ, L. 2012).

1.4 Métodos de Identificación de Carga Microbiana en Agua

Los métodos que usan para identificación de carga microbiana son procesos que admiten cultivar, identificar y cuantificar el grado de contaminación de varias muestras investigadas, donde deben cumplir un esquema para la identificación de una cepa bacteriana desde el punto de vista bioquímico:

- Conseguir un cultivo puro.
- 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: estas pruebas nos ayudan a determinar el género, grupo de géneros, o alguna familia que pertenece el aislado. catalasa, oxidasa, OF.
- Morfología de UFC en medios diferenciales, selectivos y no selectivos, donde se evidenciara el crecimiento de ciertos microorganismos con características fenotípicas observables, siendo también características diferenciales, Por otra parte puede darse la inhibición de otros por acción de agentes antimicrobianos o colorantes.
- 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.

1.4.1 Placas Petrifilm

Las placas Petrifilm son medios de cultivo deshidratados sobre películas plásticas que contiene compuestos selectivos, compuestos que gelifican en frío y colorantes para teñir las colonias facilitando su recuento e identificación., usadas en laboratorios microbiológicos e industrias alimenticias, las mismas que están compuestas por adhesivos, películas y nutrientes, para llevar a cabo pruebas microbiológicas rápidas, reproducibles, de alta eficiencia y facilidad para leer, reduciendo errores como en los métodos tradicionales de agar.

Las placas Petrifilm estandarizan y facilitan procesos de ensayos al minimizar las horas en las pruebas microbiológicas. **(3M, 2015)**.

Existe una placa para cualquier prueba microbiológica:

- Recuento de Aerobios
- Recuento de E.coli/Coliformes
- Staph Express (para recuento de *Staphylococcus aureus*)
- Recuento de Mohos y Levaduras

Las Placas Petrifilm son aprobadas por organismos internacionales, tales como:

- **AOAC** (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS)
- **AFNOR** (ASOCIACION FRANCESA DE NORMALIZACIÓN)
- **NCIMS** (U.S. GRADE A PASTEURIZED MILK ORDINANCE)

- **CANADA-HEALTH PROTECTION BRANCH HPB (COMPENDIUM OF ANALYTICAL METHODS)**
- **AUSTRALIA, NEW SOUTH WALES DAIRY TEST MANUAL. (3M, 2015)**

1.4.2 Medios de Cultivo

Un medio de cultivo es un conjunto equilibrado de un sustrato o una solución de nutrientes que en correctas concentraciones y condiciones físicas óptimas admiten un buen desarrollo de los microorganismos, que crecerán y se multiplicarán para dar colonias. **(UNIVERSIDAD DE GRANADA. 2015).**

1.4.2.1 Agar Mueller –Hinton

Es un medio enriquecido, utilizado como medio de preferencia en pruebas de sensibilidad de microorganismos frente a antibióticos. **(ALVAREZ, M., et al. 1995).**

1.4.2.2 Agar Almidón

Es un medio usado en la selección de microorganismos productores de amilasas. La actividad amilolítica se observa colocando al medio unas gotas de lugol, que tiñe al almidón de azul y deja un halo claro en el lugar donde el almidón ocasionó hidrolisis. **(MACFADDIN, J. 2000).**

1.4.2.3 Agar Gelatina

Es un medio que se emplea en estudio de microorganismos proteolíticos que degradan la gelatina por la producción de enzimas llamadas gelatinasas. **(MACFADDIN, J. 2000).**

1.4.2.4 Agar F (medio King B)

Es un medio para la identificación, detección y diferenciación de especies *Pseudomonas aeruginosas* de otras *Pseudomonas* basándose en la producción de fluoresceína. **(KONEMAN, E., et al. 2008).**

1.4.2.5 Agar Manitol Salado

Es un medio selectivo utilizado para aislar *Staphylococcus*, fundamentado en la tolerancia que presentan a una concentración elevada de cloruro de sodio. Además sirve como medio diferencial de cepas fermentadoras de manitol como lo es el *Staphylococcus, aureus*. (ALVAREZ, M., et al. 1995).

1.4.2.6 Agar con eosina y azul de metileno

Es un medio diferencial que se utiliza para las *Enterobacteriaceae*. La incorporación de lactosa en el medio permite diferenciar a los microorganismos que fermentan el azúcar de los que no lo fermentan. La flora Gram positiva (excepto *Streptococcus fecalis*) es inhibida por los colorantes. (ALVAREZ, M., et al. 1995).

1.4.2.7 Agar MacConkey

Es un medio selectivo diferencial para las *Enterobacteriaceae*. Se puede observar colonias rosas o rojas por la fermentación de la lactosa, los microorganismos no fermentadores de lactosa, producen colonias incoloras y transparentes. El cristal violeta inhibe la flora Gram positiva. (ALVAREZ, M., et al. 1995).

1.4.2.8 Agar Salmonella-Shigella

Es un medio diferencial, altamente selectivo usado en el aislamiento de Salmonella y Shigella. El verde brillante, sales biliares y altas concentraciones de tiosulfato y citrato inhiben bacilos Gram negativos y cocos Gram positivos. Las colonias lactosa positiva aparecen de color rosas o rojas. Las colonias lactosa negativa son incoloras. Existen bacterias que producen sulfhídrico por reducción del tiosulfato, en presencia de iones hierro, observando colonias con centro negro. (ALVAREZ, M., et al. 1995).

1.4.2.9 Agar Hugh-Leifson (OF)

Es un medio de cultivo, que al ser suplementado con hidratos de carbono se utiliza para determinar el metabolismo oxidativo-fermentativo de bacterias Gram negativas. Además se puede diferenciar movilidad y producción de gas. (MACFADDIN, J. 2000).

1.4.2.10 Agar de Hierro de Kligler

Es un medio diferencial del genero *Enterobacteriaceae*, en tubos que determina la capacidad de un microorganismo para producir fermentación de hidratos de carbono (1% de lactosa y 0.1% de glucosa) en un medio basal, con o sin producción de gas y la producción de ácido sulfhídrico (H₂S). (MACFADDIN, J. 2000).

1.4.2.11 Medio SIM

Es un medio semisólido usado para la identificación y diferenciación de microorganismos del género de *Enterobacteriaceae* basándose en su movilidad, indol, y producción de sulfuro de hidrógeno. La prueba de indol determina la capacidad de un microorganismo para separar indol a partir del triptófano. La movilidad se demuestra por el enturbiamiento del medio o por el crecimiento que difunde más allá de la línea de inoculación. Y la formación de sulfuro se evidencia por la formación de un precipitado negro. (MACFADDIN, J. 2000).

1.4.2.12 Agar Urea

Es un medio utilizado para la determinación de bacilos entéricos, basándose en la actividad ureásica. Las bacterias que poseen la enzima ureasa que descomponen compuestos orgánicos, usaran el nitrógeno que proviene de la urea, para hidrolizar y liberar amoniaco y dióxido de carbono. Estos productos metabolizan y alcalinizan el medio haciendo un viraje de amarillo al rojo. (MACFADDIN, J. 2000).

1.4.2.13 Agar Citrato Simons

Es un medio utilizado en la determinación de un microorganismo para usar el citrato como única fuente de carbono y energía, el metabolismo y crecimiento, mediante la alcalinidad. (MACFADDIN, J. 2000).

1.4.3 Descripción macroscópica

La identificación de bacterias se basa en las características observables, como la morfología, desarrollo y características bioquímicas y metabólicas, además se debe observar otras características como:

- **Morfología:** es fundamental en la identificación inicial y para la diferenciación de los microorganismos, se examina colonias de cultivos frescos crecidas en medios no selectivos.
- **Forma de la colonia completa:** puede ser puntiforme, circular, irregular, rizoide y filamentosa. Los bordes que pueden ser lisos, rugosos e irregulares y el grosor o elevación de la colonia se refiere a ser abultada o plana.
- **Textura:** puede variar desde seca a viscosa, con superficie lisa o granular, consistencia cremosa membranosa o mucoide que se prueba con el asa.
- **Tamaño:** es generalmente uniforme entre una misma especie.
- **Características ópticas:** se observa la luz transmitida a través de la colonia.
- **Color:** Ciertos microorganismos ocasionan colonias pigmentadas, lo que puede ser de ayuda en el trascurso de identificación como por ejemplo: *Pseudomonas aeruginosa* produce un pigmento verde. (FERNÁNDEZ, A., et al. 2010).

1.4.4 Tinción Diferencial de Gram

Esta tinción diferencial utiliza de inicio un colorante primario, cristal violeta, el que va a teñir a todas las células, se realiza un lavado y se coloca en el segundo reactivo que es una solución de lugol, se lava nuevamente con agua, se decolora con alcohol etílico/acetona algunas células, se escurre y se lava con agua y finalmente se coloca el cuarto y último colorante, la safranina que es el colorante de contraste que teñirá las células recién decoloradas.

Las bacterias Gram positivas y Gram negativas se teñirán según la constitución de la estructura de las paredes celulares. (FORBES, B. 2007).

1.4.5 Pruebas Bioquímicas Individuales para la identificación de bacterias

1.4.5.1 Prueba de catalasa

La catalasa es una enzima que tienen la mayoría de las bacterias, cuya función es catalizar la ruptura del agua oxigenada, liberando oxígeno al ambiente. Esta prueba nos ayuda a probar la presencia de la enzima catalasa. (MACFADDIN, J. 2000).

1.4.5.2 Prueba de oxidasa

Esta prueba se basa en la producción bacteriana de una enzima oxidasa intracelular. Esta reacción oxidasa se debe a un sistema de citocromo oxidasa que activa la oxidación del citocromo reduciendo oxígeno molecular. **(MACFADDIN, J. 2000).**

1.4.5.3 Prueba de hidrolisis de la gelatina

Determinar la capacidad de un microorganismo de producir enzimas proteolíticas (gelatinasas), que hidrolizan la gelatina, mostrando cambios característicos de degradación del medio. **(MACFADDIN, J. 2000).**

1.4.5.4 Prueba de hidrolisis del almidón

Determina la capacidad de un microorganismo de hidrolizar el almidón por medios enzimáticos, observando la desaparición del almidón por uso del reactivo con yodo. **(MACFADDIN, J. 2000).**

1.4.5.5 Prueba de oxidación-fermentación

Determina el metabolismo oxidativo o fermentativo de un hidrato de carbono o su falta de utilización. **(MACFADDIN, J. 2000).**

1.4.5.6 Prueba de movilidad

Determinar si un microorganismo es móvil o inmóvil. Los microorganismos son móviles por medio de un único flagelo o muchos flagelos. Los microorganismos inmóviles carecen de flagelos. **(MACFADDIN, J. 2000).**

1.4.6 Sistema Miniaturizado para identificación de cepas (Microgen GN-ID)

El sistema Microgen GN-ID utiliza 24 (GN A+B) sustratos bioquímicos estandarizados en micropocillos para la identificación de la familia *Enterobacteriaceae* y otros bacilos no exigentes Gram negativos oxidasa positiva y negativa.

Los micropocillos contienen substratos deshidratados cromogénicos y/o fluorogénicos que se reconstituyen con una suspensión salina del organismo a identificar, si estos microorganismos metabolizan a los substratos se observara un cambio de color. Estos sistemas surgen con el fin de reducir el volumen de reactivos y medio a emplear en los ensayos. (**MICROGEN BIOPRODUCTS. 2015**)

1.4.7 Antibiograma

El antibiograma es un estudio *in vitro* del comportamiento de la resistencia o el grado de sensibilidad de los microorganismos frente a los antimicrobianos.

El objetivo es proporcionar información necesaria para iniciar un tratamiento terapéutico antiinfeccioso y conocer la tendencia de sensibilidad de cada especie bacteriana, su coeficiente de benignidad frente a los antimicrobianos usados y el índice de concentración adecuada. (**ALVAREZ, M., et al. 1995**).

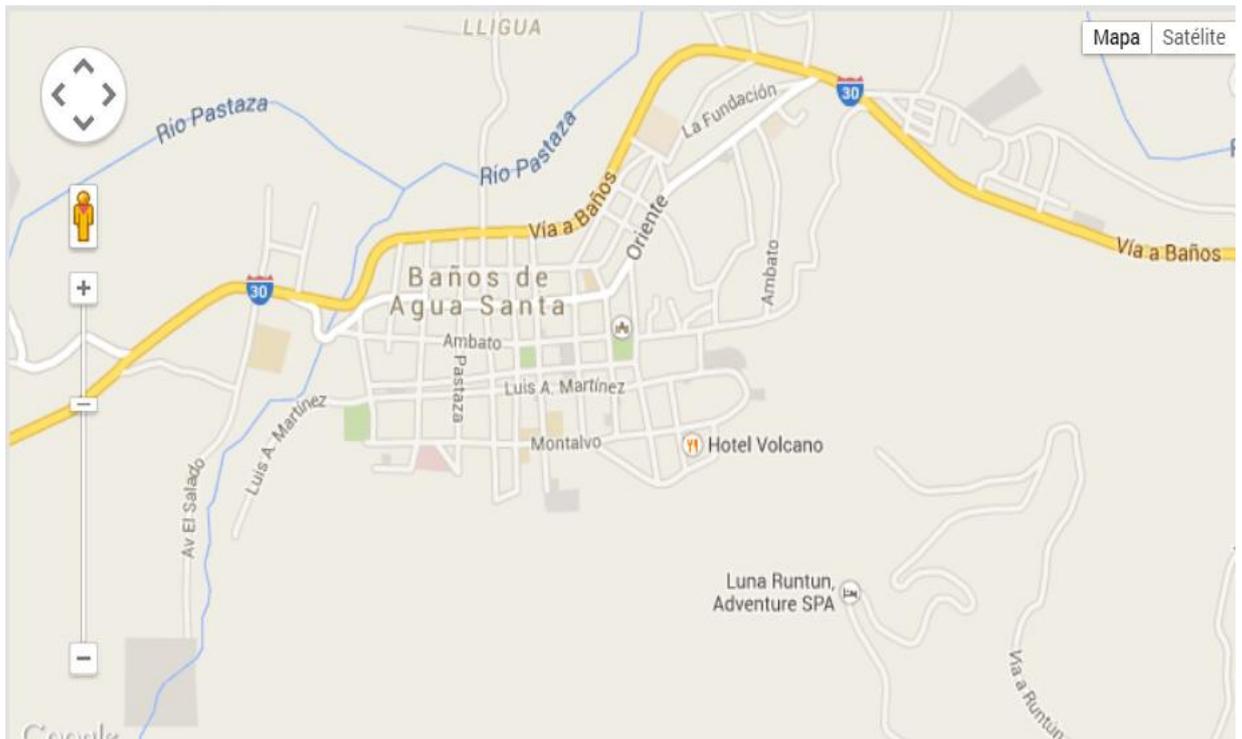
1.5 Termales de “El Salado”

1.6.1 Ubicación

El balneario de “El Salado” se ubica en la provincia de Tungurahua, en el cantón Baños, en la avenida de El Salado a 1 Km de la vía principal de Ambato-Baños. Es una ciudad turística ubicada en un valle con cascadas y aguas termales a lado del volcán Tungurahua con una altura de 5016 metros. (**VIAJANDOX.COM. 2014**).

Las actividades que se efectúan en esta zona están representadas por la agricultura y el turismo que ofrece gracias a las piscinas de aguas termales, en este caso del Balneario “El Salado” la misma que forma parte de la cuenca del Pastaza, se encuentra en las coordenadas: ESTE (UTM) 785653 y NORTE (UTM) 9844452. Posee una elevación de 1929 MSNM. (**INAMHI. 2013**).

Figura 2-1: Mapa de ubicación del Balneario “El Salado” (Baños-Tungurahua)



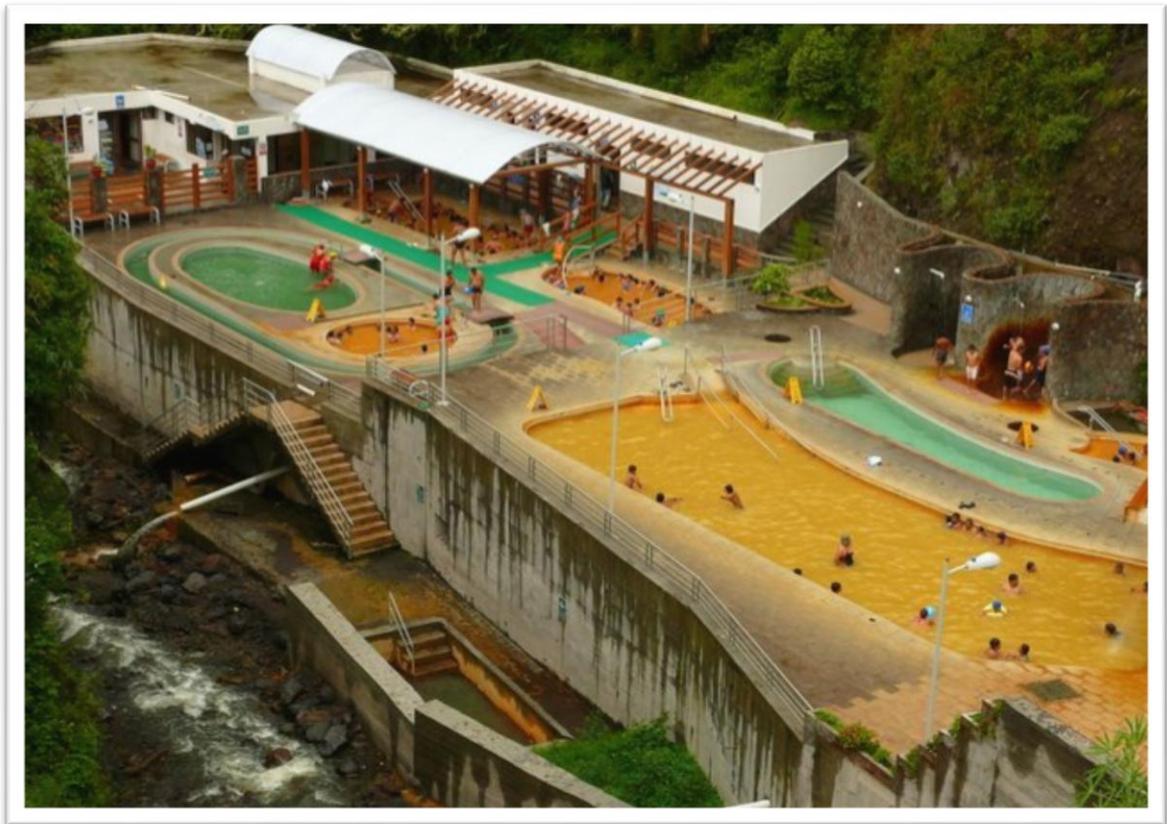
Fuente. Datos de mapas de Google 2014.

1.6.2 Descripción

Las termas de “El Salado”, en la actualidad, utiliza dos puntos de surgencia el del occidente y del oriente. El punto de emergencia estudiado es del occidente, se encuentra en el interior del Balneario, el agua es captada en el punto de surgencia por un tanque de hormigón, cubierto por una tapa metálica, en la base se ha colocado un tubo plástico para la salida del agua, a través de una canalización llega a las piscinas al aire libre.

Estas aguas emergen a una temperatura de 55⁰C, que proceden desde el Volcán Tungurahua, son aguas neutras, poseen aniones y cationes en diferentes concentraciones. (VIAJANDO.COM, 2014).

Figura 3-1: Balneario “El Salado” en el cantón Baños de Agua Santa-Tungurahua



Fuente: Fotografiasdeecuador.com. 2015

Las aguas termales contienen cloruro de sodio, anhídrido carbónico libre, óxido de silicio, potasio en cloruro, sulfato de magnesio, bicarbonato de magnesio, bicarbonato de calcio y bicarbonato de hierro; por todos los elementos anteriores estas aguas son muy mineralizadas y son del grupo de las sulfatadas magnésicas, salino termales . (INAMHI. 2013).

Las aguas sulfatadas poseen una concentración mayor de 1 g/L de minerales totales disueltos, siendo el SO_4^{2-} el ion dominante. Según los cationes más cuantiosos, pueden ser sulfatadas sódicas, magnésicas, cálcicas o mixtas.

En su totalidad las aguas sulfatadas poseen acción purgante, siendo esta acción más abundante en las sulfatadas sódicas y magnésicas que en las sulfatadas cálcicas. La vía de administración es oral y tópica por medio de baños.

Además las aguas del Balneario " El Salado", son hipertermales, extremadamente dura (3640 mg/L), una turbidez de 71 y de alcalinidad 1244. (INAMHI, 2013), (ver Tabla 6-1).

Tabla 6-1: Balance iónico de aguas termales del Balneario " El Salado"

BALANCE IÓNICO			
ANIÓN	mg/l	CATIÓN	mg/l
CO₃H⁻	1244,00	Na⁺	398,47
CO₃⁼	0,0	K⁺	64,87
SO₄⁼	3306,0	Ca⁺⁺	142,70
Cl⁻	670,01	Mg⁺⁺	797,9
NO₃⁻	0,20	NH₄⁺	0,210
NO₂	0,050	Fe⁼	3,234
PO₄⁼	< 0,5		
OTRAS DETERMINACIONES			
pH	7.3	Cobre	< 0,25
Turbidez	71	Cromo	< 1
Dureza (mg/l)	3640	Plomo	< 1
Temperatura (°C)	55,00	SiO₂	147,1
Color	135	Cobre	< 0,25
Alcalinidad	1244	Mn	0,616
STD	4244,32		
CE (µs/cm)	6560		
CO₂	124,16		

Fuente. INAMHI (2013)

Este sector posee una temperatura de 19.5° C y la temperatura de las termas son de 52 °C a 55 °C, las mismas que poseen poderes curativos de enfermedades como: reumatismos, artritis, varicosas, trastornos hepáticos, vesiculares enfermedades del estómago, lesiones cutáneas como eczemas, desequilibrios metabólicos causados por el estrés. **(INAMHI. 2013)**

CAPÍTULO II

2 PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Lugar de Investigación

La zona de estudio está ubicada en la ciudad de Baños de Agua Santa, provincia de Tungurahua, aquí se efectúa los muestreos. En este lugar de estudio, en el Balneario “El Salado” se realizara pruebas in situ de pH, temperatura, conductividad, sólidos totales y toma de muestras.

Para la ejecución del análisis microbiológico se realizara en:

- **LUGAR:** Laboratorio de Análisis Bioquímicos y Bacteriológico - Facultad de Ciencias - Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- **CANTÓN:** Riobamba
- **PROVINCIA:** Chimborazo.

2.2 Factores de Estudio

2.2.1 Población

El grupo poblacional para el desarrollo del estudio será las aguas termales del Balneario “El Salado” de Baños de Agua Santa, de la provincia de Tungurahua.

2.2.2 Toma de muestra

Se efectuó un muestreo en el balneario “El Salado” se tomaron muestras del agua en el punto de emergencia y en la piscina. La muestra fue tratada por duplicado.

El volumen de cada muestra fue de 100 mL de agua termal del Balneario “El Salado”, se recolectaron a 1929 msnm, siendo las 18h36 horas, en el cantón Baños de Agua Santa, Provincia de la provincia de Tungurahua.

2.3 Materiales, Equipos y Reactivos

Cuadro 1-2: Materiales de Laboratorio

Mandil	Puntas azules
Cofia	Puntas amarillas
Guantes desechables	Lámpara de alcohol
Mascarilla	Reverbero
Cámara fotográfica	Vaselina
Marcador indeleble	Erlenmeyer de 500 mL
Algodón	Filtros
Toallas adsorbentes	Probeta de 50, 100 mL
Alcohol	Placas portaobjetos
Envases de plástico estériles de 120 mL	Asa de platino
Coolers con bolos de hielo	Aguja
Pipetas fijas de 100 μ L	Palillos
Pipetas fijas de 1000 μ L	Pinza punta plana
Cajas Petri	OXOID Discos de sensibilidad
Hisopos de algodón	

Realizado por: NÚÑEZ, Sandra; 2015

Cuadro 2-2: Equipos

Multiparámetro HANNA
Cámara de flujo laminar
Estufa bacteriológica
Microscopio
Autoclave

Realizado por: NÚÑEZ, Sandra; 2015

Cuadro 3-2: Reactivos

Agua destilada
Cloruro mercurico
Kovac's
Kit de Tinción Gram: - cristal violeta - lugol - alcohol-acetona - safranina

Realizado por: NÚÑEZ, Sandra; 2015

Cuadro 4-2: Medios de Cultivo

Placas 3M ^M Petrifilm Aerobios totales
Placas 3M TM Petrifilm <i>E. Coli</i> -Coliformes
Placas 3M TM Petrifilm Mohos y Levaduras
Placas 3M TM Petrifilm <i>Staph</i> Express
Acumedia Agar Mueller-Hinton
Medio de Hugh-Leifson
Agar F (medio King B)
Agar movilidad
Agar almidón
Agar gelatina
Merck Agar Eosina Azul de Metileno
BD (BACTO-DIFCO BBL) Agar MacConkey
BD (BACTO-DIFCO BBL) Agar Manitol Salado
BD (BACTO-DIFCO BBL) Agar Salmonella-Shigella
BD (BACTO-DIFCO BBL) Agar Hierro de Kligler
BD (BACTO-DIFCO BBL) Medio SIM
Merck Agar Urea
Merck Agar Citrato de Simmons

Realizado por: NÚÑEZ, Sandra; 2015

2.4 Métodos y Técnicas

Método

El método utilizado para el conteo de microorganismos es en Placas 3MTM PetrifilmTM por siembra directa. (3M. 2014)

Técnicas

2.4.1 Muestreo

2.4.1.1 Captación en el Ojo de Agua

- Se debe lavar las manos y antebrazos con agua y jabón.
- Se debe colocar las prendas de protección (cofia, mascarilla y guantes estériles.)
- Se debe quitar el plástico de protección evitando que se contamine.
- La toma de muestra debe efectuarse con la boca del frasco en contracorriente.
- Efectuada la toma de muestra cerrar el frasco bajo el agua, posteriormente sellar ésta fuera del agua, con un sello a prueba de derrames, no debemos olvidar de dejar un espacio libre requerido para la agitación de la muestra previa al análisis. (NTE INEN. 1983).

2.4.1.2 Captación de un Tanque de Almacenamiento (Piscina)

- Se debe lavar las manos y antebrazos con agua y jabón.
- Se debe colocar las prendas de protección (cofia, mascarilla y guantes estériles.)
- Se debe quitar el plástico de protección evitando que se contamine.
- Se sumerge el frasco en el agua con el cuello hacia abajo hasta una profundidad de 15 a 30 cm, abrir y enderezar a continuación con el cuello hacia arriba.
- Efectuada la toma de muestra cerrar el frasco bajo el agua, posteriormente sellar ésta fuera del agua, con un sello a prueba de derrames, no debemos olvidar de dejar un espacio libre requerido para la agitación de la muestra previa al análisis. (NTE INEN. 1983).

2.4.1.3 Identificación y Conservación de las Muestras

Se debe asegurar que cada muestra esté identificada correctamente mediante un rótulo o etiqueta que sea indeleble, la misma que debe poseer localización y nombre del sitio de muestreo, detalles del punto de muestreo (temperatura ambiente), fecha y hora de recolección, tipo de análisis a efectuar, nombre de la persona que realiza el muestreo, basándonos en la NTE INEN 2176:2013.

Para la conservación de la muestra es recomendable el empleo de coolers con bolos de hielo específicos para bacterias, 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.

2.4.2 Determinación del Análisis Físico-Químico (Multiparámetro de HANNA)

En el lugar de estudio in situ: Se recoge en un recipiente estéril de boca ancha, una muestra representativa de agua termal. Se enciende el instrumento, se escoge en el menú la opción de calibración, se sumerge la sonda en la muestra de agua termales, el medidor visualizara las lecturas relativas de los parámetros habilitados (pH, conductividad, solidos disueltos totales), al finalizar el análisis se debe lavar con agua destilada.

La temperatura del agua termal y la temperatura del ambiente, se la determina con ayuda de un termómetro y un termohigrómetro respectivamente.

2.4.3 Método para determinación de carga bacteriana

2.4.3.1 Petrifilm siembra en placas

El análisis microbiológico inicia con la desinfección de la cámara de flujo, con ayuda del UV, por unos 30 minutos aproximadamente.

Inoculación de placas

1. Se coloca la Placa 3M™ Petrifilm™ en una superficie lisa y plana.
2. Se levanta la lámina superior y con una pipeta se agrega perpendicularmente 1 ml de la muestra en el centro de la lámina inferior.
3. Se suelta la lámina superior sobre la muestra, para evitar la formación de burbujas de aire.
4. Se coloca el 3M Petrifilm Difusor, de la parte lisa contar el centro de la Placa 3M Petrifilm. Se presiona suavemente el centro del 3M Petrifilm Difusor, para distribuir homogéneamente la muestra.
5. Se retira el 3M Petrifilm Difusor y se deja reposar la Placa 3M™ Petrifilm™ por lo menos 1 minuto para permitir que se forme el gel. (3M, 2014)

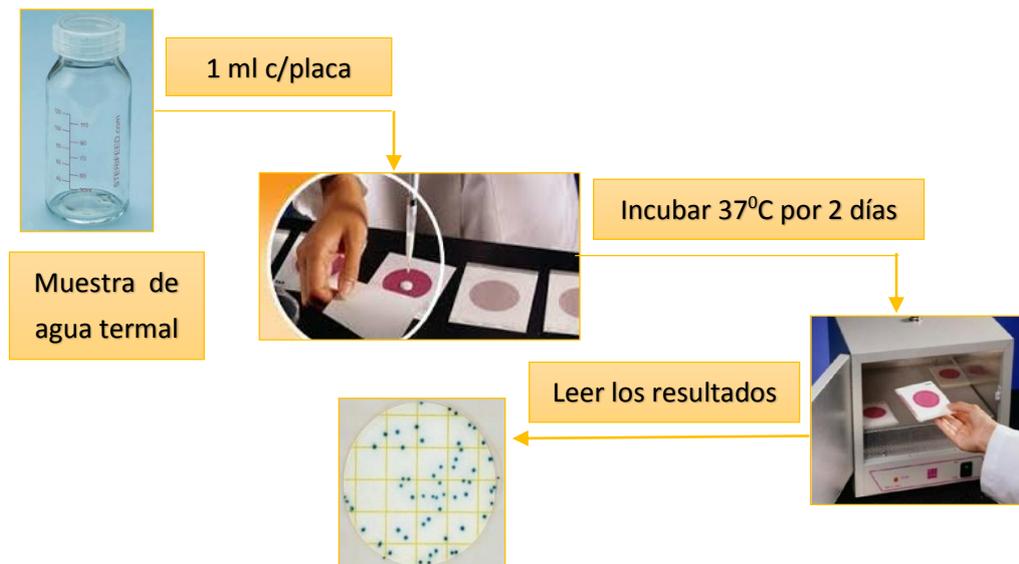
Incubación

Se Incuba las Placas 3M™ Petrifilm™ en posición horizontal con la zona transparente hacia arriba en pilas de no más de 20 placas. Se pueden utilizar varios tiempos y temperaturas de incubación según los métodos de referencia locales actuales. (3M, 2014)

Interpretación

Las Placas 3M™ Petrifilm™ se pueden contar usando una lupa. Se debe realizar el recuento de todas las colonias de color independientemente del tamaño o la intensidad. (3M, 2014)

Figura 1-2: Siembra en Placas 3M™ Petrifilm™



Fuente: ANDUEZA, F. 2014

2.4.3.2 Estabilización del aislado bacteriano

- Preparación de medio de cultivo Mueller-Hinton Agar

Se refiere a la etiqueta del envase para cantidades y volúmenes, suspendiendo los polvos en agua destilada o desionizada. Se deja embeber de 10 a 15 minutos. Se calienta con agitación frecuente y hervir durante 1 minuto para disolución total. Se autoclava a 121°C (15 p.s.i) durante 15 minutos. Se deja enfriar a 45°-50°C y se distribuye en placas de Petri estériles (15-20 mL) y se deja solidificar. Las placas de cultivo preparadas se almacenan en bolsas de plástico a 2-8 °C. (ÁLVAREZ, M., et al. 1990).

- Estabilización en Agar Mueller-Hinton

Se realizaran 3 o más repiques hasta obtener cultivos que están puros en placas con Agar Mueller-Hinton. Aquellos que visualmente se hallan contaminados se repican nuevamente hasta obtener cultivo puro. (GUZMÁN, E. 2011).

- **Siembra por Agotamiento**

Con el último repique de la estabilización bacteriana con colonias aisladas se siembra en agar nutritivo, (Mueller-Hinton) con la técnica de agotamiento:

Se toma la muestra problema con una asa de platino (previamente estéril), desde el extremo superior se reparte sobre la superficie del medio de cultivo, hasta las $\frac{3}{4}$ partes de la caja. El recorrido del asa debe ser lo más largo posible con el fin de conseguir al final del mismo células aisladas que darán lugar a colonias, flameamos el asa de platino y giramos ligeramente la placa para deslizar nuevamente la muestra, esta operación se repite 4 veces.

Después de sembrar cerrar la placa y dejar en posición invertida para llevar a incubar a 37°C. Tras 24 horas de incubación, notamos que en el estriamiento inicial aparece una masa continua de microorganismos, donde no se puede diferenciar colonias, sin embargo, al final de éstas las colonias están mejor aisladas y se aprecian las diferencias entre ellas como son el tamaño, color y forma, pudiendo obtener un cultivo puro.

Si no se obtiene colonias aisladas se puede realizar un segundo aislamiento de las colonias dudosas para proceder a obtener cultivos puros. Los cultivos puros de microorganismos son mantenidos en el laboratorio por resiembras sucesivas, es decir, pasar de un medio de cultivo a otro. **(UNIVERSIDAD DE GRANADA, 2015)**

2.4.3.3 Tinción Gram

Con los cultivos puros obtenidos por agotamiento se usan para verificar su pureza mediante la ejecución de una Tinción Gram:

- En un porta objetos contenido con la muestra, se coloca 2 gotas de cristal violeta durante 1 minuto.
- Se lava cuidadosamente con agua para descartar el exceso de colorante y se sacude.
- Se añade 2 gotas de lugol por 1 minuto.
- Se lava con agua nuevamente.
- Se aplica gota a gota el decolorante alcohol-acetona, hasta que no fluya más lugol.
- Inmediatamente se lava con agua.
- Se aplica 2 gotas de safranina durante 1 minuto y lavar cuidadosamente con agua.
- Se seca la placa al ambiente y se observa con objetivo de inmersión. **(AQUIAHUATI, M., et al, 2004).**

2.4.3.4 Prueba de catalasa para colonias bacterianas aisladas

Para esta prueba con una aguja de inoculación se depositó una cantidad de colonia pura de un cultivo de 24 horas, se coloca sobre un portaobjeto limpio. Se coloca una gota de agua oxigenada (H₂O₂), sobre los microorganismos colocados en el portaobjetos. La reacción es positiva si existe liberación de burbujas. Descartar el portaobjetos en un desinfectante. (MACFADDIN, J. 2000).

2.4.3.5 Pruebas de oxidasa para colonias bacterianas aisladas

Para esta prueba utilizamos tiras de papel impregnadas con el reactivo para-amino-N-dimetil-anilina, que se oxida por la citocromo-oxidasa. Se debe impregnar en la tira reactiva una masa de bacterias. Si en el transcurso de un minuto la zona impregnada vira a un color azul-violeta, se considera positiva. (MACFADDIN, J. 2000).

2.4.3.6 Investigación de Bacilos Gram Positivos

- Preparación de Agar almidón

Composición:

Extracto de carne	3,0	g
Almidón soluble	10,0	g
Agar	12,0	g
Agua destilada	1000,0	ml

Realizado por: NÚÑEZ, Sandra; 2015

Se disuelve en el agua todos los componentes por calentamiento suave y ajustar el pH a 7,5. Se esteriliza en autoclave a 121° C durante 15 minutos. Se distribuye en placas Petri estériles a razón de 20 ml. (KONEMAN, E., et al, 2008).

- Hidrólisis del almidón

Se inoculo el microorganismo en agar almidón. Se incubo a 30° C durante 8 días. Cuando la colonia ha desarrollado lo suficiente, se añade 3 gotas de solución yodo yodurado. Se considera positiva la hidrólisis del almidón cuando en torno a la colonia se observa una zona clara. (MACFADDIN, J. 2000).

- Preparación de Agar gelatina

Composición:

Extracto de carne	3,0	g
Gelatina	30,0	g
Agar	12,0	g
Agua destilada	1000,0	ml

Realizado por: NÚÑEZ, Sandra; 2015

Se disuelve en el agua todos los componentes por calentamiento suave y se ajusta el pH a 7,2. Se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Se distribuye en placas Petri estériles a razón de 20 ml.

- Hidrólisis de la gelatina

Se inoculó el microorganismo en medio agar gelatina. Se incubo a 30°C durante 8 días. Cuando la colonia ha desarrollado lo suficiente, se recubre la superficie del medio con unas gotas de cloruro mercuríco. Se considera positiva la prueba al observarse una zona clara alrededor de la colonia. (MACFADDIN, J. 2000).

Reactivo de cloruro mercuríco

Composición:

Cloruro mercuríco	12,0	g
Ácido clorhídrico concentrado	16,0	ml
Agua destilada	80,0	ml

Realizado por: NÚÑEZ, Sandra; 2015

Se mezcla el cloruro mercuríco con el agua y se añade el ácido lentamente agitando continuamente. Se puede utilizar ácido tricloroacético al 30% en lugar de la solución de cloruro mercuríco.

2.4.3.7 Investigación de Cocos Gram Positivos

- Preparación de Agar Manitol Salado

Se suspende 10,8 g de medio deshidratado en 1 litro de agua destilada. Se mezcla vigorosamente. Se calienta agitando frecuentemente y hervir durante 1 minuto para disolver completamente los ingredientes. Ajustar pH a $7,4 \pm 0,2$. Se esteriliza a 121°C durante 15 minutos. Se deja enfriar hasta una temperatura entre $40-45^{\circ}\text{C}$, se verte en placas estériles y se deja solidificar a temperatura ambiente antes de su utilización. **(BLB™, 2006)**

2.4.3.8 Investigación de Bacilos Gram Negativos

- Preparación de Agar Eosina Azul de Metileno

Se suspende 37,5 g en 1 litro de agua destilada, se calienta y se agita hasta ebullición y hervir durante 1 minuto. No sobrecalentar. Ajustar a pH $7,2 \pm 0,2$ y esterilizar a 121°C durante 15 minutos. **(BLB™, 2006)**

- Preparación de Agar MacConkey

Se suspende 50 g del polvo en 1 L de agua purificada. Se mezcla bien. Se calienta agitándolo frecuentemente y hervir durante 1 minuto para disolver completamente el polvo. Se ajusta el pH a $7,1 \pm 0,2$. Se autoclava a 121°C durante 15 minutos. **(BLB™, 2006)**

- Preparación de medio Hugh-Leifson (OF)

Composición:

Triptona	2,0	g
Cloruro sódico	5,0	g
Fosfato dipotásico	0,3	g
Agar	3,0	g
Agua destilada	1000,0	ml

Realizado por: NÚÑEZ, Sandra; 2015

Se disuelve todos los componentes en el agua, a excepción del agar y se ajusta a pH 7,1. Se añade 15 ml de azul de bromotimol al 0,2% y el agar, calentando hasta ebullición para que se disuelva por completo. Se Distribuye en cantidades de 100 ml y se esteriliza en autoclave a 121° C durante 15 minutos.

Se atempera a 45-50° C y se añade asépticamente a 100 ml de medio estéril, 10 ml de una solución de glucosa al 10% esterilizada por filtración, mezclando a fondo. Se dispensa asépticamente cantidades de 5 ml en tubos estrechos estériles de 8x160 mm. Se mantiene los tubos en posición vertical. (MACFADDIN, J. 2000).

- *Preparación de Agar movilidad*

Composición:

Extracto de carne	3,0	g
Peptona	10,0	g
Cloruro sódico	5,0	g
Agar	4,0	G
Agua destilada	1000,0	MI

Realizado por: NÚÑEZ, Sandra; 2015

Se disuelve en el agua todos los componentes en el agua. Se ajusta el pH a 7,3. Se distribuye en tubos a razón de 5 ml, se esteriliza a 121° C durante 15 minutos y se deja solidificar en posición vertical. (MACFADDIN, J. 2000).

- *Preparación de Agar Salmonella Shigella*

Se suspende 60 g del polvo en 1 L de agua destilada. Se mezcla bien. Se calienta agitándolo frecuentemente y hervir durante 1 minuto para disolver completamente el polvo. Se ajusta a pH $7,0 \pm 0,2$. NO ESTERILIZAR EN AUTOCLAVE. Se enfría a 45-50 °C y se usa de inmediato. Se deja que las placas se sequen durante aproximadamente 2 horas. (BLB™, 2013)

Identificación de Pseudomonas aeruginosa

- Preparación de Agar (King B)

Composición:

Peptona	20,0	g
Glicerol	10,0	g
Fosfato potásico	1,50	g
Sulfato magnésico	1,50	g
Agar	15,00	g
Agua destilada	80,0	ml

Realizado por: NÚÑEZ, Sandra; 2015

Se disuelve en el agua todos los componentes por calentamiento suave. Se ajusta el pH a $7,0 \pm 0,2$. Se esteriliza en autoclave a 121°C durante 20 minutos. Se distribuye en placas Petri estériles a razón de 20 ml.

2.4.3.9 Pruebas Bioquímicas

- Preparación de Agar Hierro de Kligler

Se suspende 52 g del polvo en 1 L de agua destilada. Se mezcla bien. Se calienta agitándolo frecuentemente y hervir durante 1 minuto para disolver completamente el polvo. Ajustar pH a $7,4 \pm 0,2$. Se autoclava a 121°C durante 15 minutos. Se enfría el medio en el tubo en posición parcialmente inclinado. **(BLB™, 2013)**

- Preparación de Medio SIM

Se suspende 30 g del polvo en 1 L de agua destilada. Se mezcla bien. Se calienta agitándolo frecuentemente y hervir durante 1 minuto. Se ajusta el pH a $7,3 \pm 0,2$. Se autoclava a 121°C durante 15 minutos. **(BLB™, 2013)**

- *Preparación Urea Agar (base) CHRISTENSEN*

Se disuelve 21 g en 1 litro de agua desmineralizada calentando en un baño de agua hirviendo, se trata en autoclave (15 minutos a 121 °C). Antes de usar, licuar el medio y a 45-55 °C se añade mezclando a 50ml/L de una solución de urea al 40% filtrada estérilmente, se prepara en tubos de agar inclinado. Se ajusta el pH $6,8 \pm 0,2$ (MERCK, 2015)

- *Preparación de Agar citrato según SIMMONS*

Se disuelve 22,5 g en 1 L de agua purificada, calentando en un baño de agua hirviendo o en corriente de vapor. Ajustar pH a $6,6 \pm 0,2$. Se trata en autoclave (15 minutos a 121°C). Se verte en tubos de agar inclinado. (MERCK, 2015).

2.4.3.10 Identificación taxonómica de las colonias aisladas

Las cepas aisladas y puras de bacterias se identificaran por características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas, mediante observación del cultivo y observación microscópica. Las pruebas de identificación de especie se realizan mediante el sistema Microgen™ GN-ID Identificación.

INOCULACIÓN E INCUBACIÓN

1. Se realiza una prueba de oxidasa del organismo aislado.
2. Se emulsifica una colonia obtenida de un cultivo de 18-24 horas en 3-5 mL de solución salina estéril al 0,85% para la tira GN A y GN B. Se mezcla bien.
3. Se quita cuidadosamente la lámina adhesiva que sella los pocillos.
4. Se añade 3-4 gotas (aproximadamente 100µL) de la suspensión bacteriana a cada pocillo de las tiras.
5. después de la inoculación, se recubre los pocillos marcados con un círculo negro alrededor de las dos tiras con 3-4 gotas de aceite mineral.
6. se sella la parte superior de las tiras con la cinta adhesiva que se retiró en un inicio y se incuba a 35-37 °C.
7. Las tiras GN A y GN B se leerán después de 18-24 horas de incubación para las *Enterobacteriaceae* y luego de 48 horas para los aislados oxidasa positiva.

LECTURA Y ADICIÓN DE REACTIVOS

TIRA GN A

1. Se quita la lámina adhesiva y se anota todas las reacciones positivas con ayuda de la carta de color.
2. se añade los reactivos a los siguientes pocillos:
 - a. Se añade 2 gotas de reactivo de Kovac's al pocillo 8. Se lee a los 60 segundos. Formación de color roja revela resultado positivo.
 - b. Se añade 1 gota del reactivo VP I y 1 gota del reactivo VP II al pocillo 10. Se lee tras los 15-30 minutos, Formación de color rosa/roja revela resultado positivo.
 - c. Se añade 1 gotas de reactivo TDA al pocillo 12. Se lee a los 60 segundos. Formación de color roja cereza revela resultado positivo.
3. Se hace el test de reducción de nitrato al pocillo 7 después se lee y se anota los resultados del test ONPG. Se añade 1 gota del reactivo de Nitrato A y 1 gota del reactivo de Nitrato B al pocillo y se leen después de 60 segundos. un color rojo indica que el nitrato ha sido reducido a nitrito. Si el pocillo 7 se mantiene amarillo o incoloro después de la adición de los reactivos nitrato, se añade una pequeña cantidad de polvo de zinc.

TIRA GN B

1. Se quita la lámina adhesiva y se anota todas las reacciones positivas con ayuda de la carta de color.
2. Se lee los pocillos específicos según se indica:
 - a. el pocillo de gaitina 13 se debe leer tras 18-24 horas para *Enterobacteriaceae* y tras 48 horas para los aislados oxidasa positivo. Si se observa partículas negras es un resultado positivo.
 - b. el pocillo de la arginina se interpreta diferente tras 24 y 48 horas de incubación: 24 horas *Enterobacteriaceae* y 48 horas los aislados oxidasa positivos.

IDENTIFICACIÓN

1. Se anota los resultados en la hoja de resultados de Microgen GN-ID A+B, los substratos.
2. El perfil numérico único se introduce en un Software Microgwn Identification System (MID-60) que generara un informe de los microorganismos más parecidos, basados en la probabilidad en %,

2.4.4 Antibiograma

- El medio de cultivo que cumple con todas las condiciones y es apto para cualquier tipo de antibiograma aerobio es el Mueller-Hinton Agar.
- Para el inculo se prepara una suspensión de la colonia problema de un cultivo de 24 horas. Se ajusta esa suspensión con el 0,5 de la escala turbidimétrica de McFarland equivalente a 10^8 UFC/ml.
- Los antimicrobianos a elegir en cada test de sensibilidad dependerá del microorganismo aislado y su actividad será en (μ g o UI/ml).
- Para la incubación de antibiogramas de aerobios será a 35 °C durante 16-20 horas.
- La lectura de los halos se efectúa a las 18 horas de incubación a 35 °C, con ayuda de una regla milimetrada. El diámetro del halo de inhibición se relaciona con la susceptibilidad del microorganismo frente al antibiótico estudiado.

2.4.5 Flujogramas de identificación de especies y géneros

Figura 2-2: Identificación general de bacterias aisladas en la piscina. A

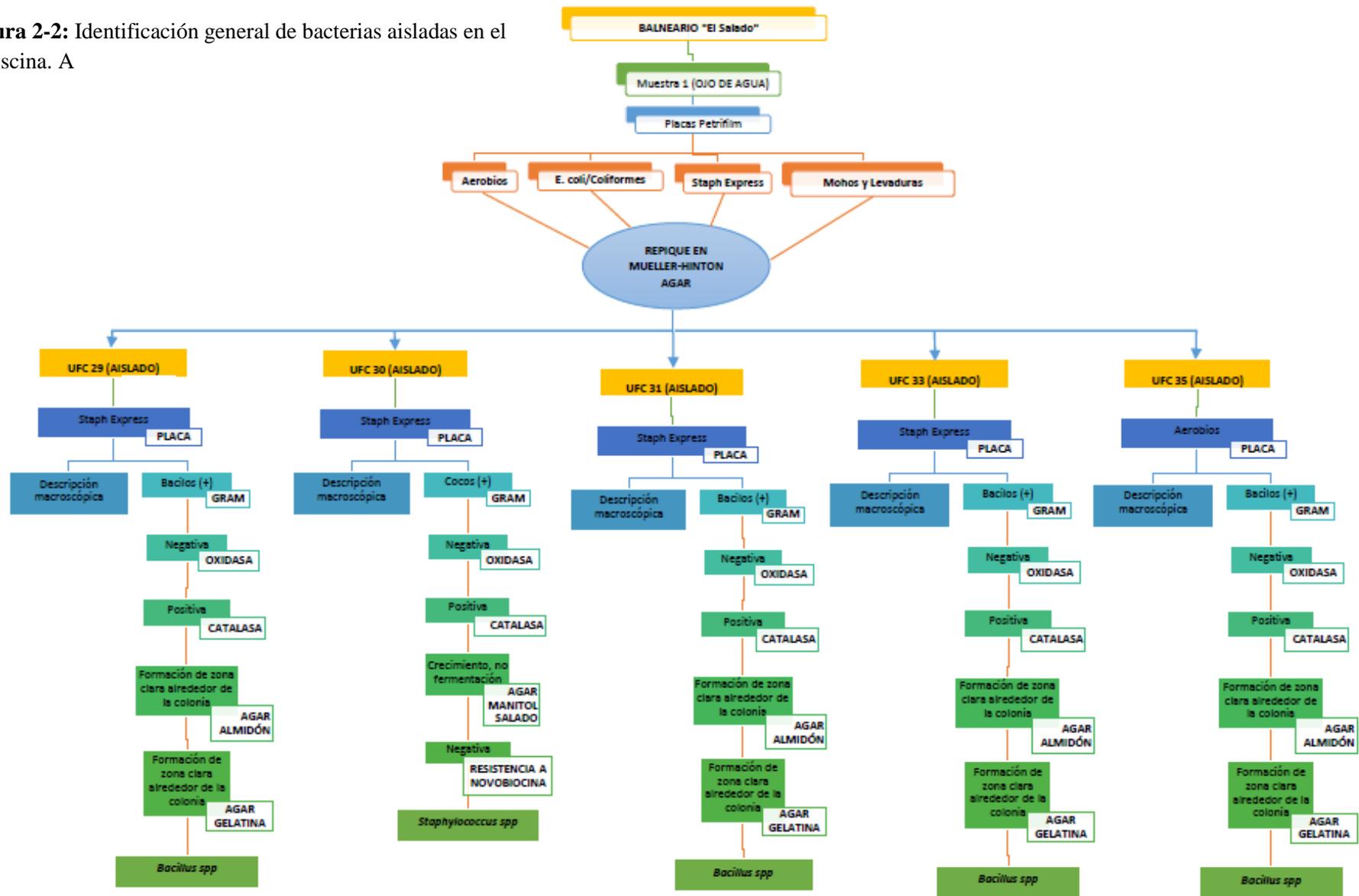


Figura 3-2: Identificación general de bacterias aisladas en la piscina. A

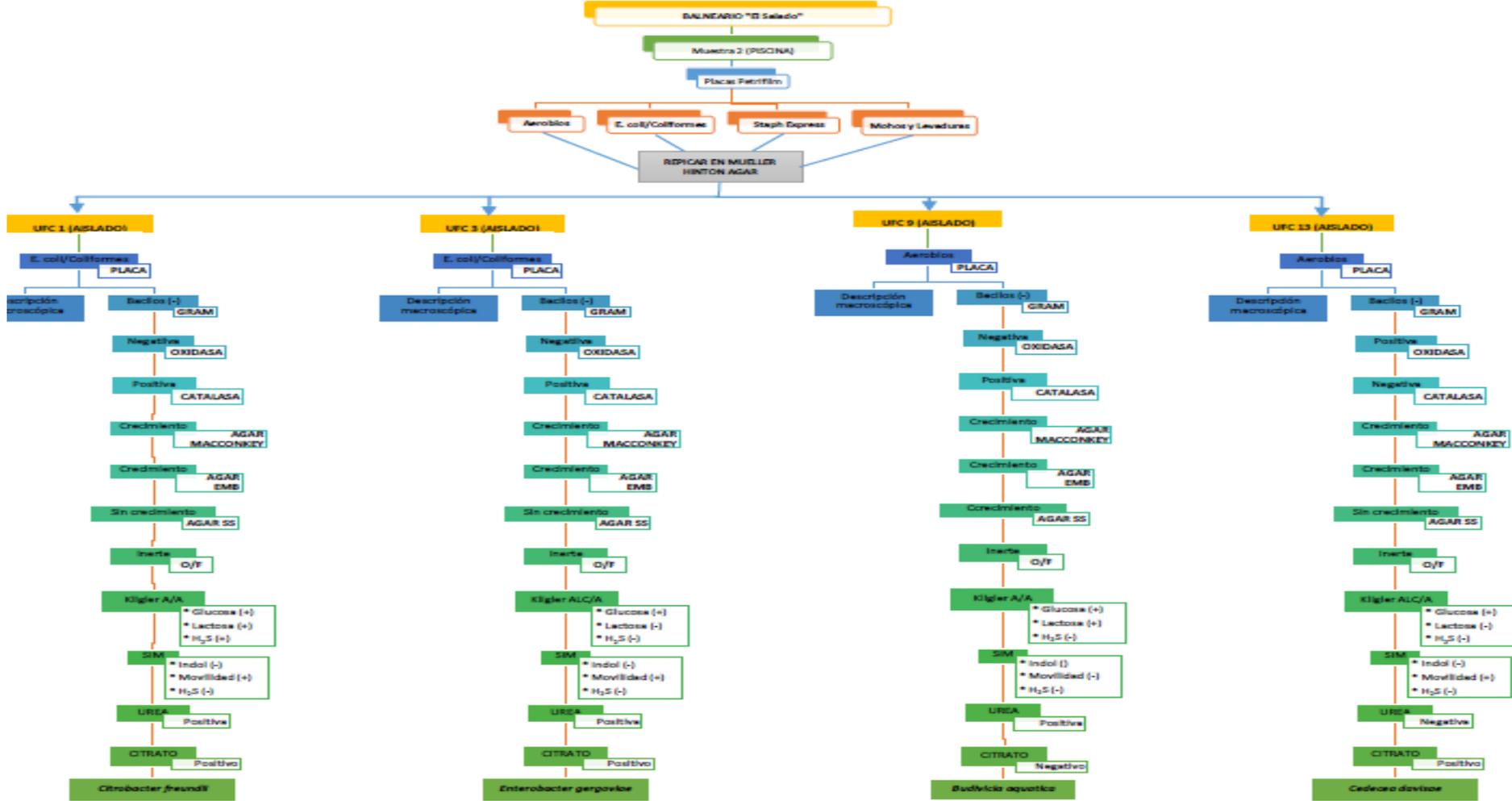


Figura 2-2: Identificación general de bacterias aisladas en el la piscina. B

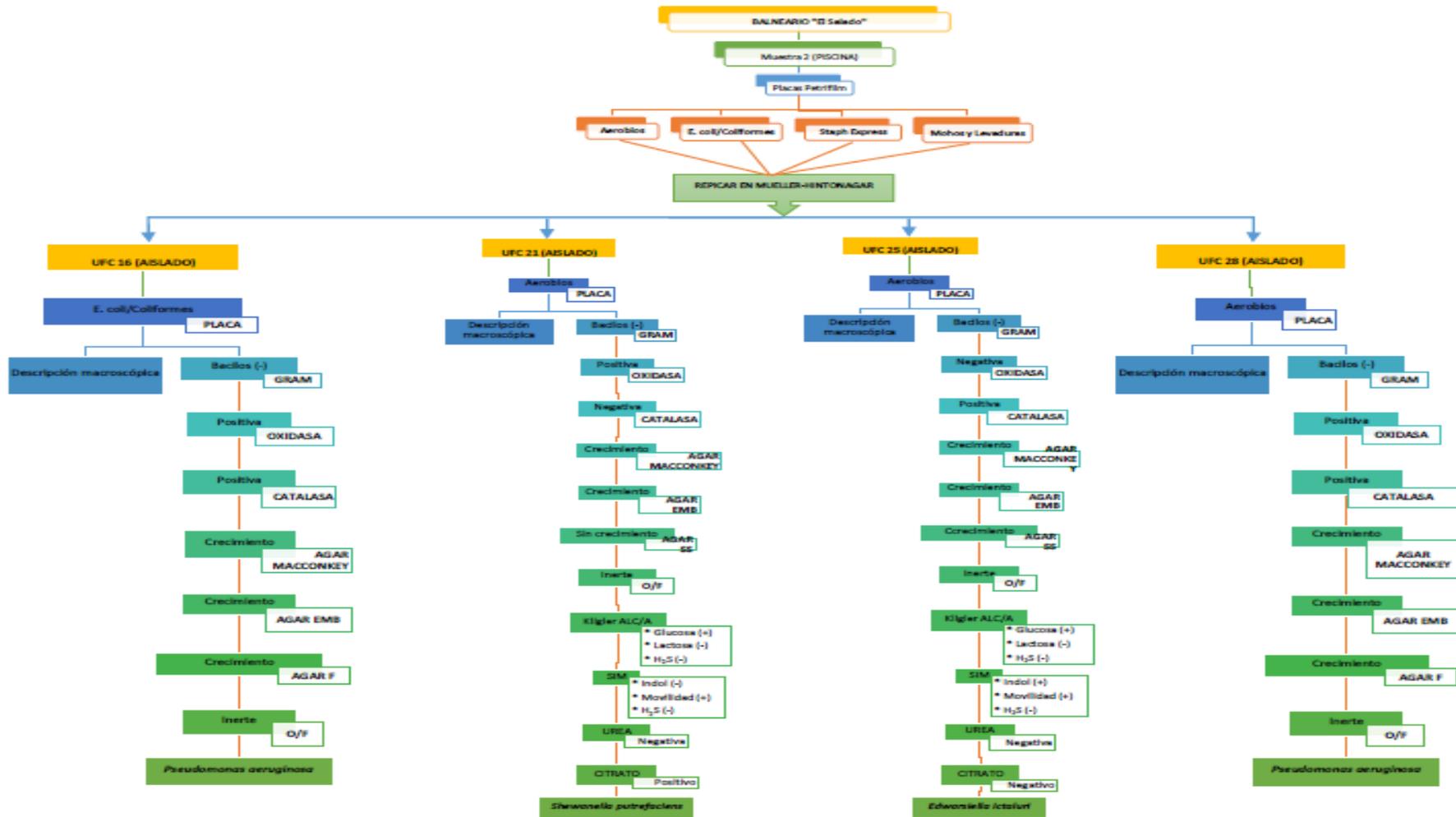


Figura 2-2: Identificación general de bacterias aisladas en el la piscina. C

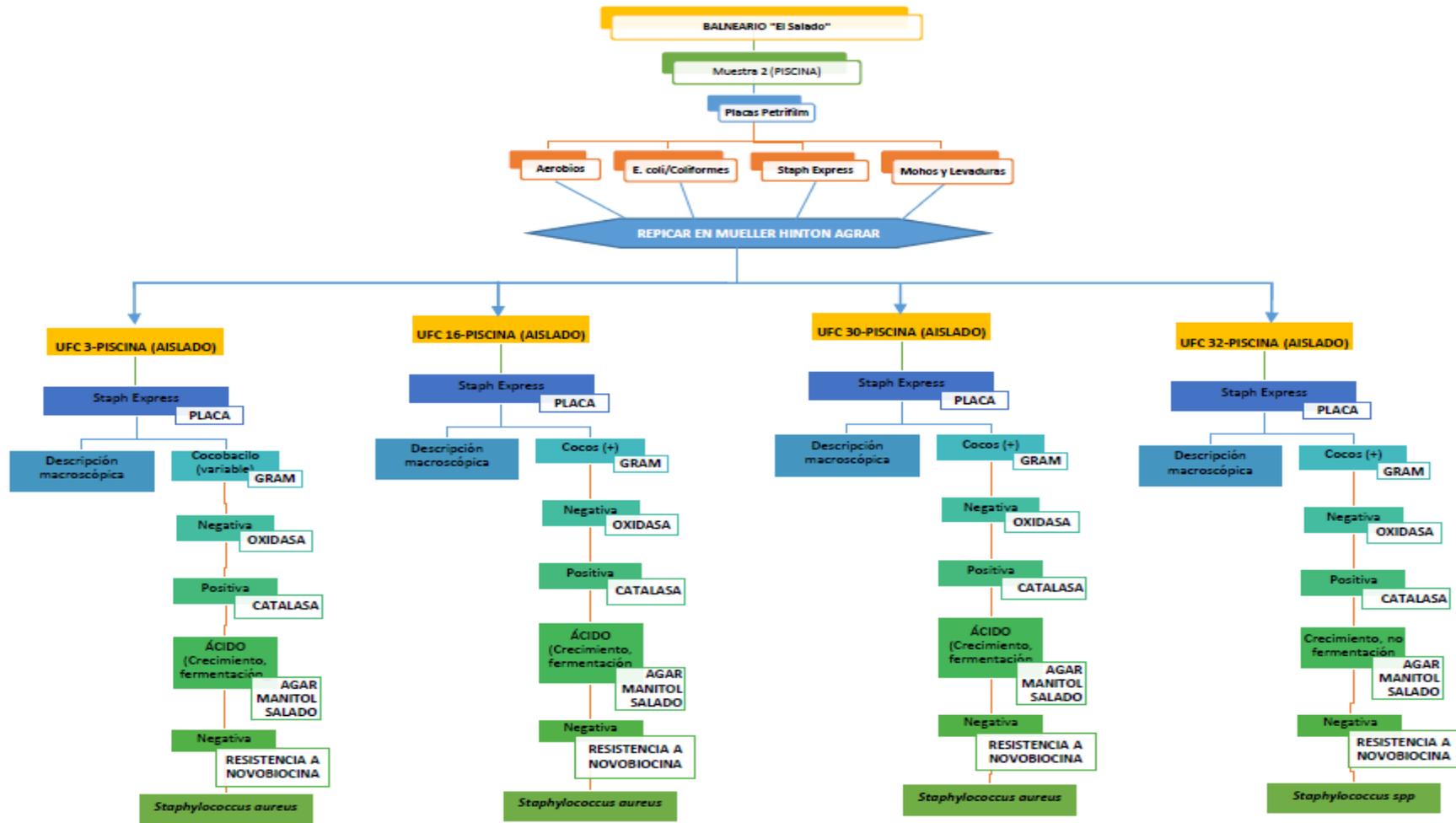


Figura4-2: Esquema de identificación de *Bacillus spp*

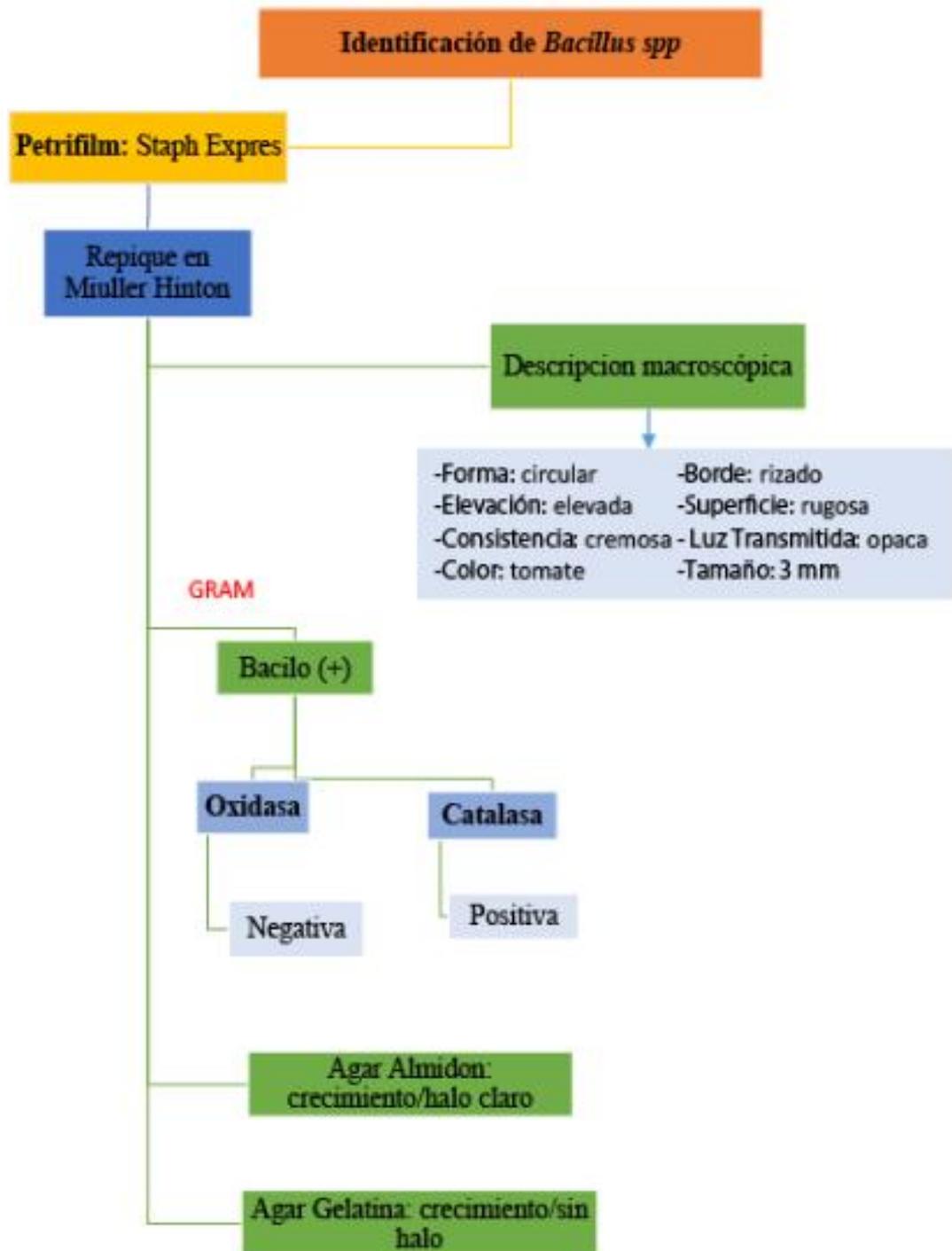


Figura 5-2: Esquema de identificación de *Staphylococcus spp*

Identificación de *Staphylococcus spp*

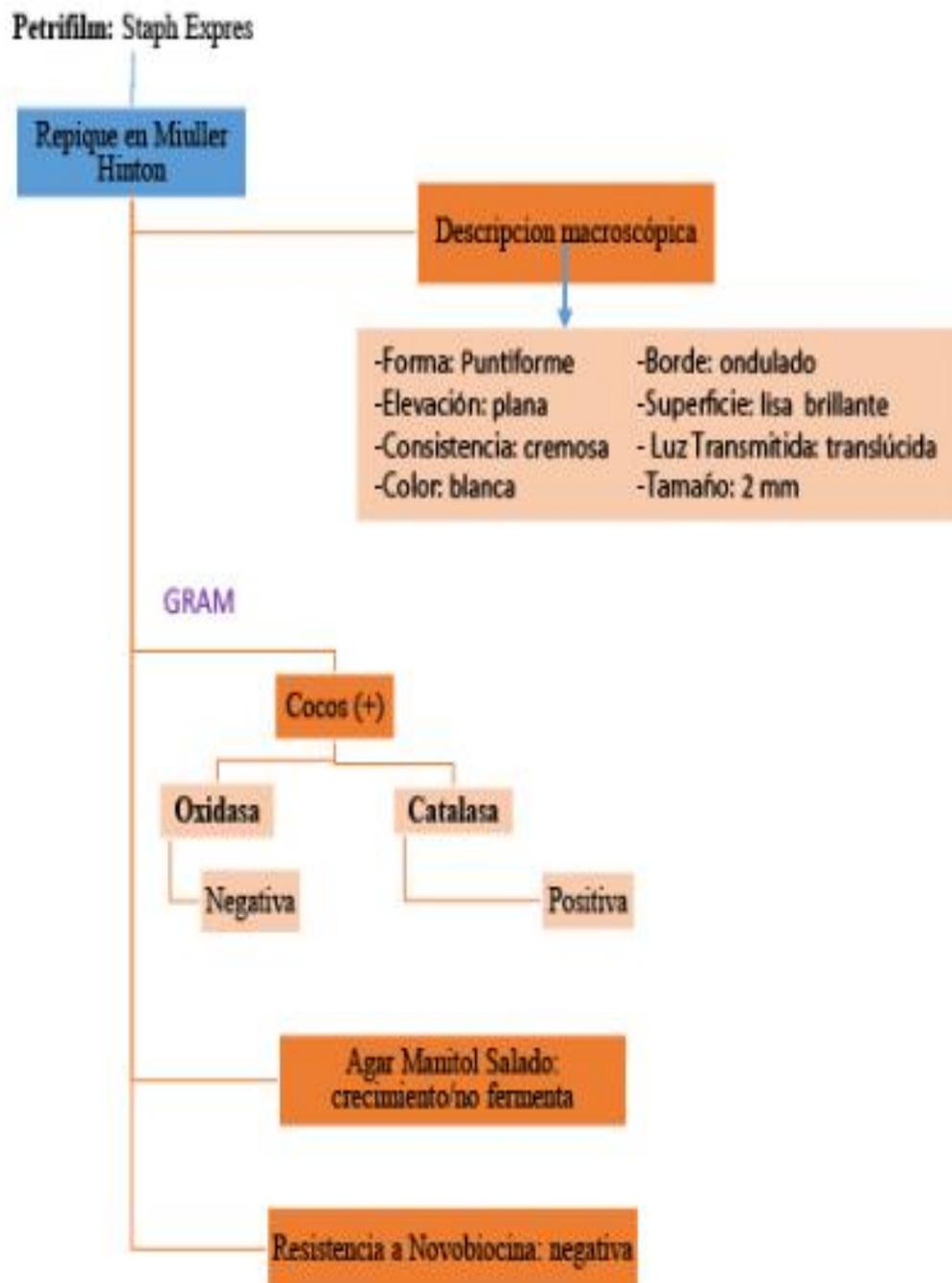


Figura 6-2: Esquema de identificación de *Staphylococcus aureus*

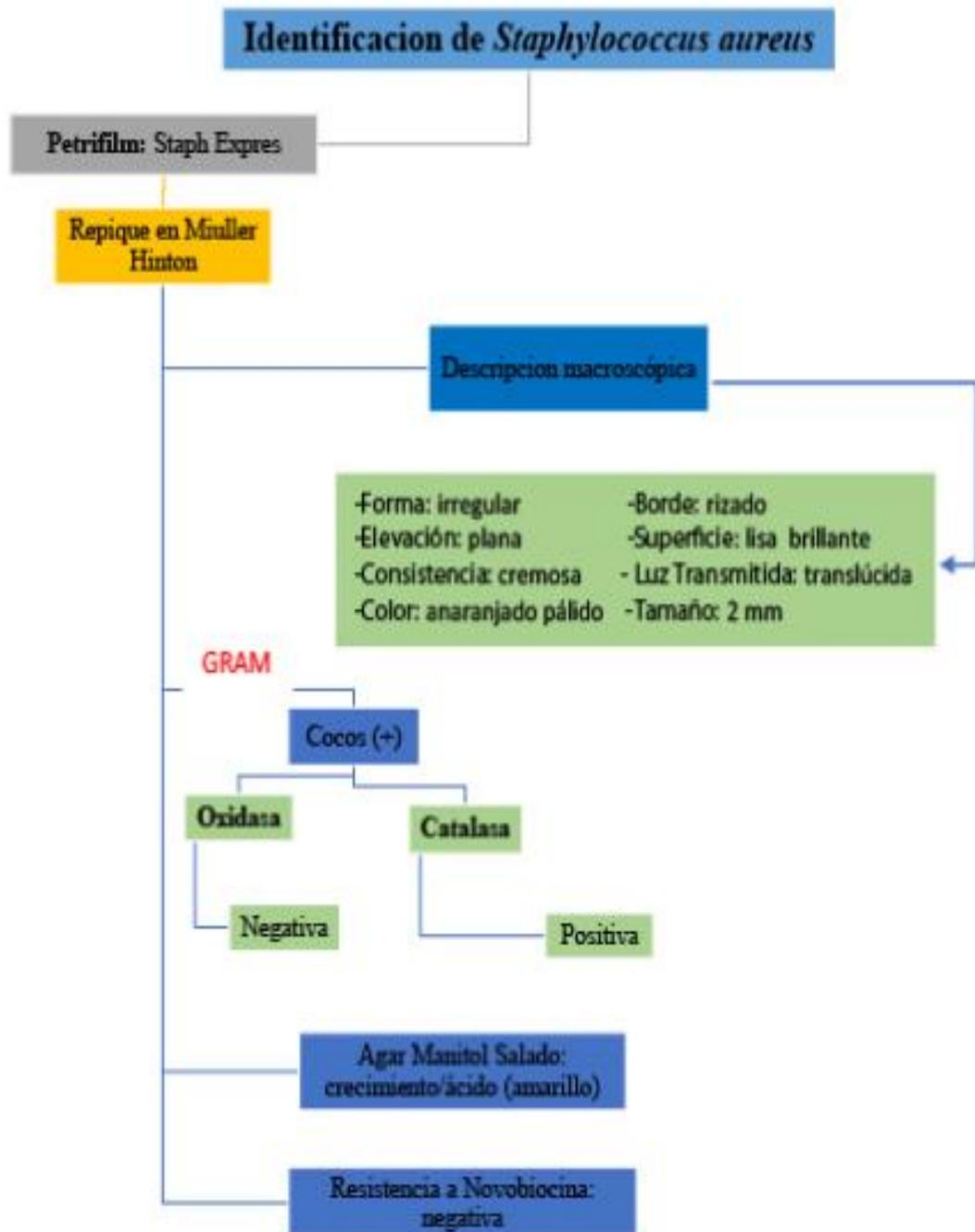


Figura 7-2: Esquema de identificación de *Citrobacter freundii*

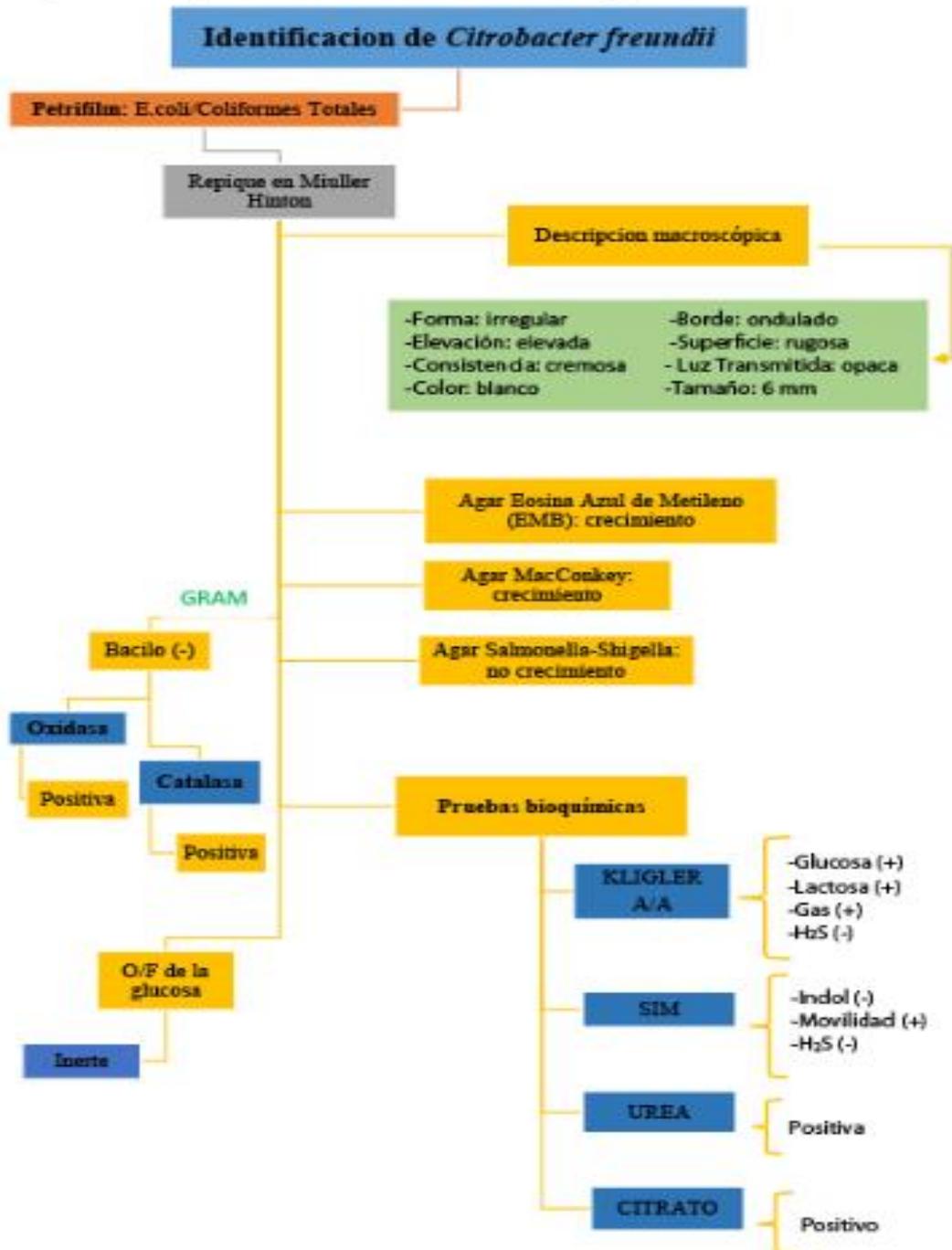


Figura 8-2: Esquema de identificación de *Enterobacter gergoviae*

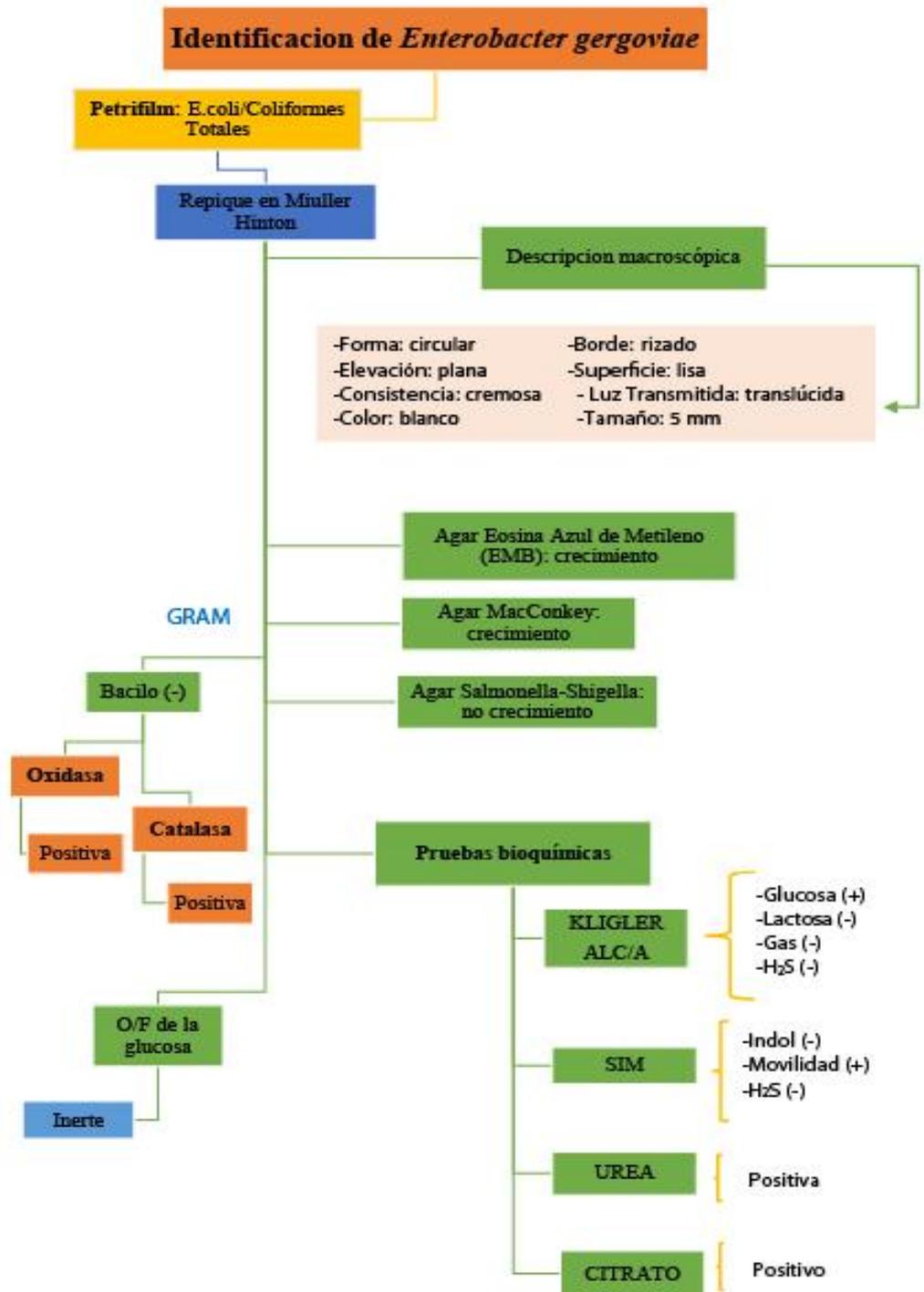


Figura9-2: Esquema de identificación de *Budvicia aquatica*

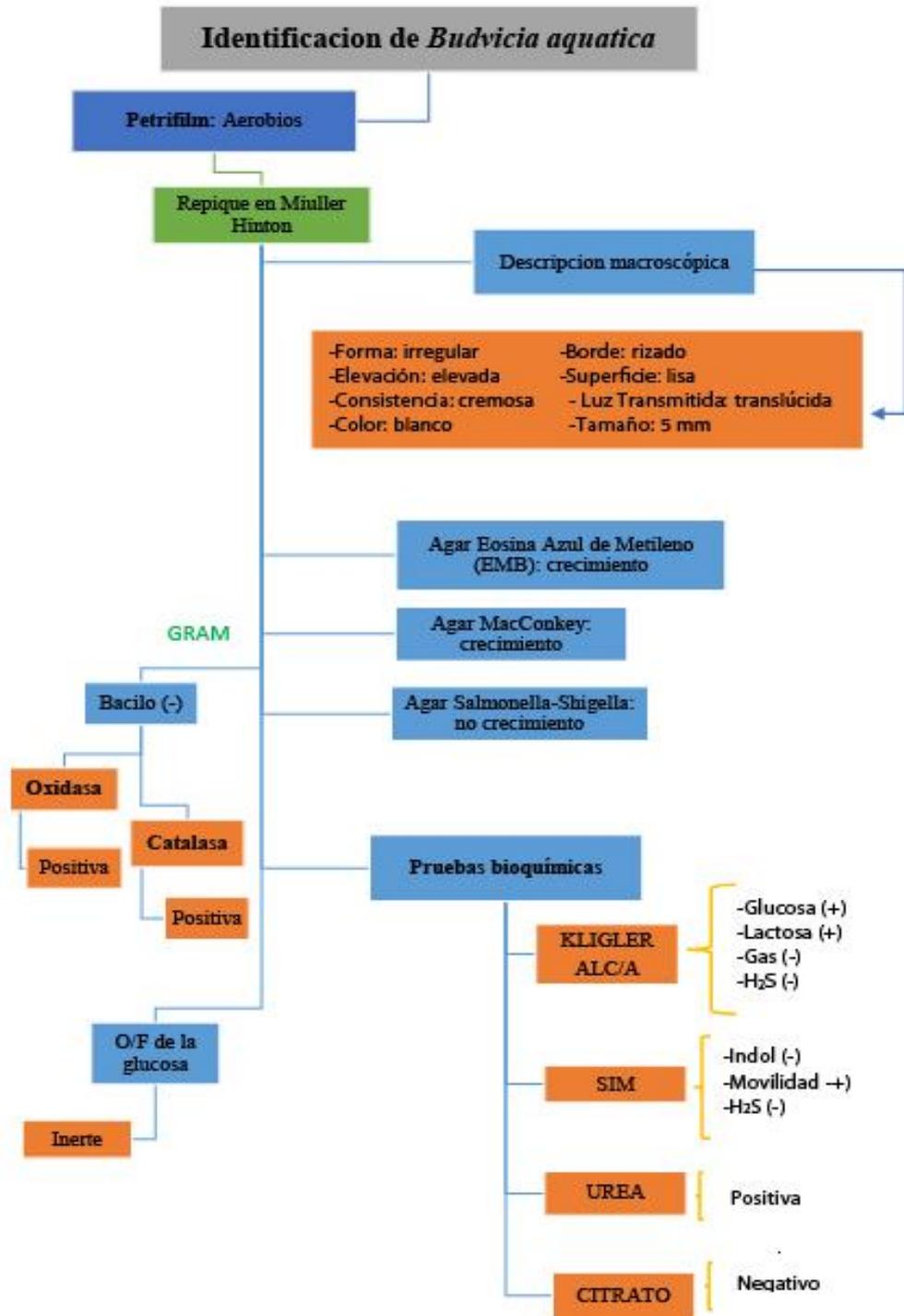


Figura 10-2: Esquema de identificación de *Cedecea davisae*

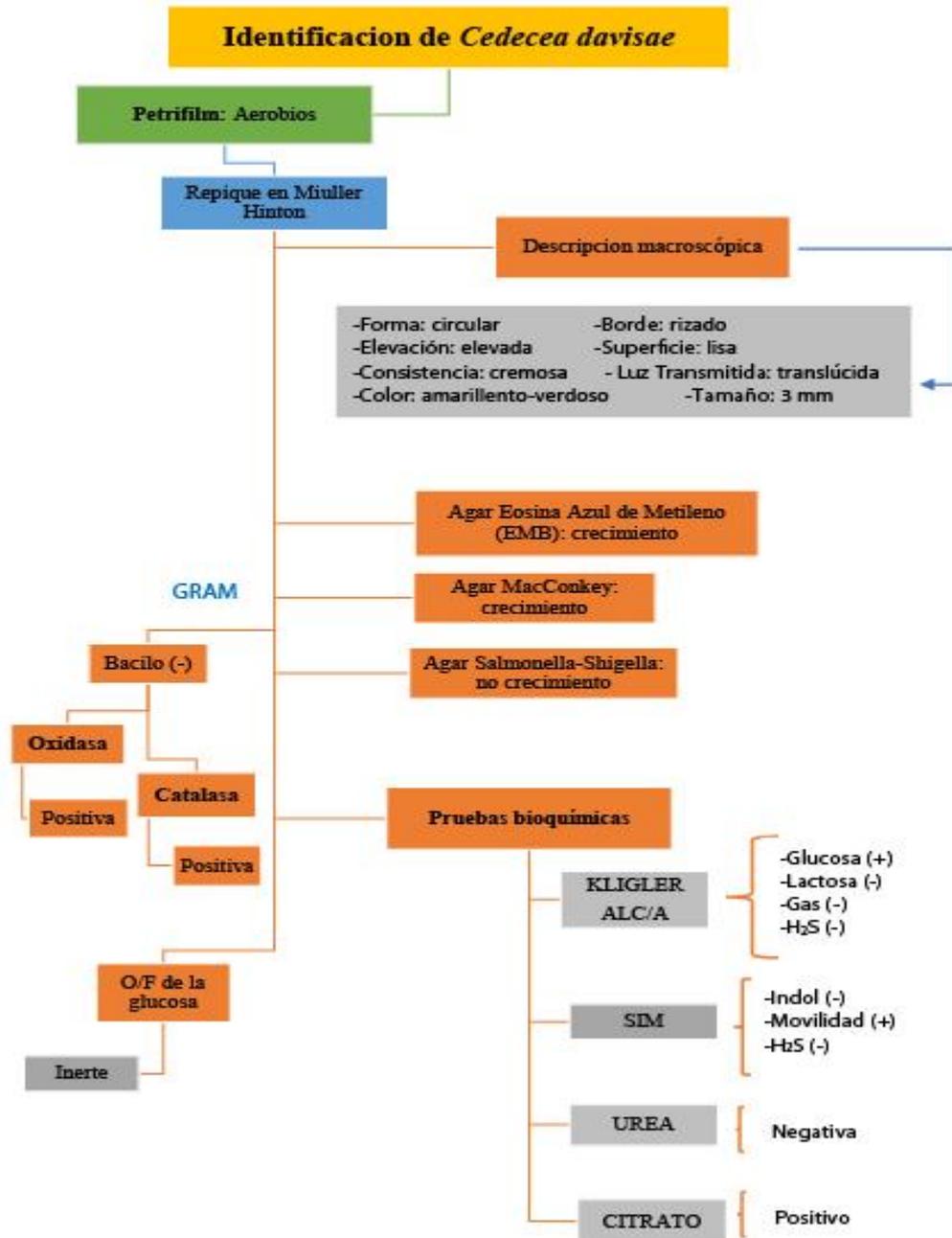


Figura 11-2: Esquema de identificación de *Pseudomonas aeruginosa*

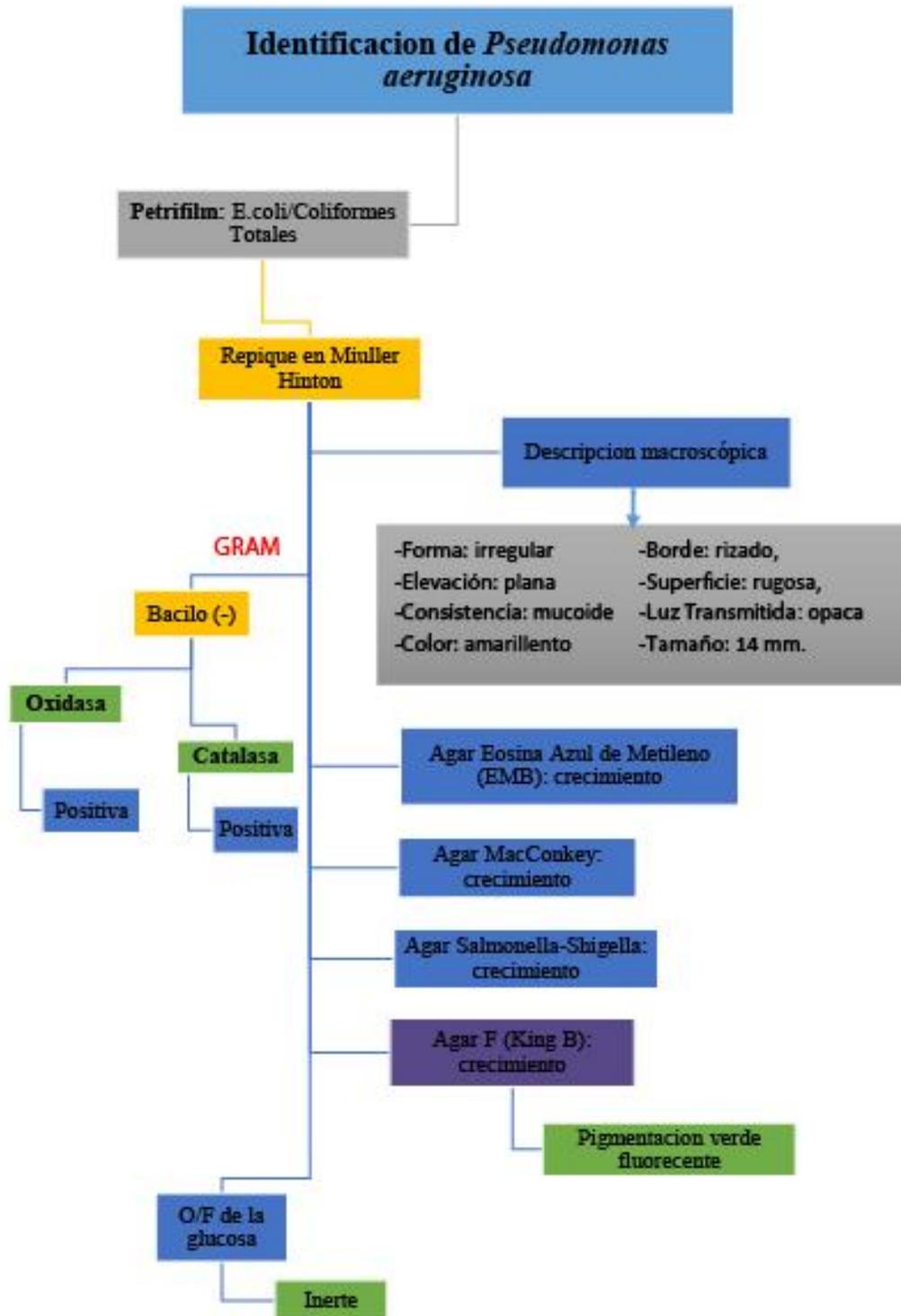
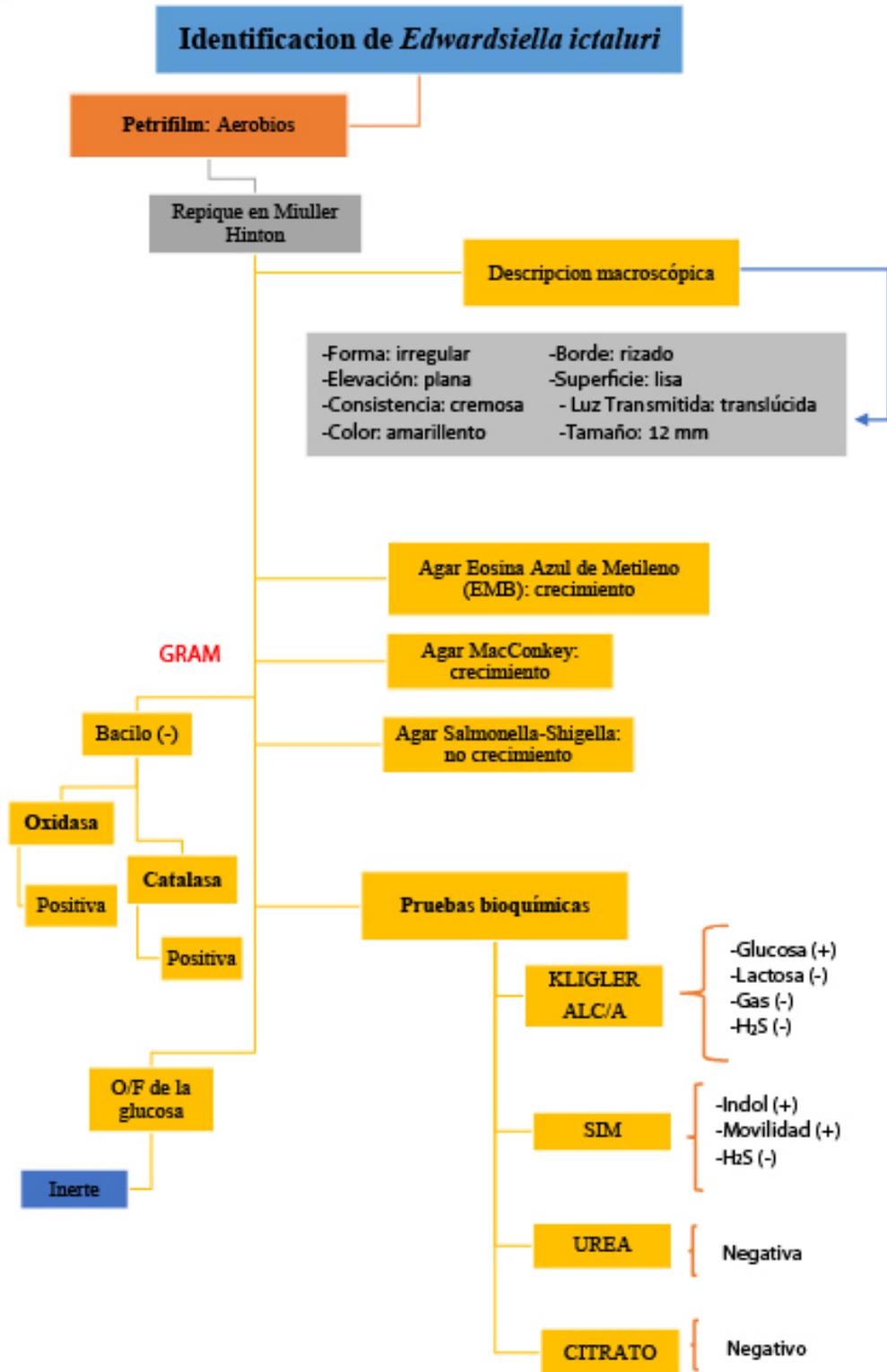


Figura 12-2: Esquema de identificación de *Edwardsiella ictaluri*



CAPÍTULO III

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados presentados en las tablas corresponden a valores promedios obtenidos en las determinaciones microbiológicas de un muestreo en dos orígenes: ojo de agua y piscina, se obtuvieron dos muestras de cada origen del Balneario “El Salado” de Baños de Agua Santa, provincia de Tungurahua.

3.1 Propiedades físico-químicas del Balneario “El Salado” de Baños de Agua Santa-Tungurahua.

Tabla 1-3: Constantes físico químicas

Parámetros	Unidades	Ojo de agua	Piscina
Temperatura ambiente	°C	19 °C	20°C
Temperatura del agua	°C	48.7°C	40.2°C
pH	Unidades pH	7,0	6,9
Conductividad Eléctrica	μS/cm	3900	3999
Solidos Totales Disueltos	Ppm	2000	2000

Fuente: NÚÑEZ, S., 2015

°C: grados Celsius, ppm: partes por millón.

La temperatura registrada en el ojo de agua tuvo un valor promedio de 48.7°C, por otro lado la temperatura reportada en la piscina del balneario fue un valor promedio de 40.2°C y la temperatura ambiental registro valores de 19-20°C.

El Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología en aguas termominerales en el Ecuador (2013) reporta que la temperatura de las aguas del Balneario “El Salado” oscila entre 55 °C, esta temperatura es mayor a la reportada en este estudio. De igual con estas temperaturas estas aguas se consideran hipertermales.

El Vademécum de Aguas Mineromedicinales Españolas (2004), considera hipertermal a las aguas que presentan una temperatura mayor de 37°C. Otros autores como Schoeller (1962), Castany (1971), Karakolev (1984) Gramova et al (1994), Armijos y San Martin (1994), la clasifican como hipertermales por que se tratan de aguas con una temperatura entre 37-100 °C, (FAGUNDO, J y GONZÁLEZ, P., 2007).

En función a las mediciones del pH se determina que estas aguas tienen un pH neutro reportando valores promedios de 6,95. De modo que al comparar con el estudio de aguas termominerales en el Ecuador (2013), estas aguas son alcalinas porque reportan un valor de pH de 7,3. Este pH revela que estas aguas son neutras por estar entre 6,8 y 7,2.

Los valores de conductividad eléctrica fueron $\geq 3999 \mu\text{S/cm}$. En aguas termominerales en el Ecuador (2013), reportan valores de $6560 \mu\text{S/cm}$. Por lo tanto estas aguas son de alta capacidad para conducir la corriente. (INAMHI, 2013).

Los sólidos totales disueltos fueron $\geq 2000 \text{ ppm}$. En aguas termominerales en el Ecuador (2013), registran un valor de 4198 ppm. Por lo tanto con estos valores obtenidos se trata de aguas de salinidad muy alta. (INAMHI, 2013).

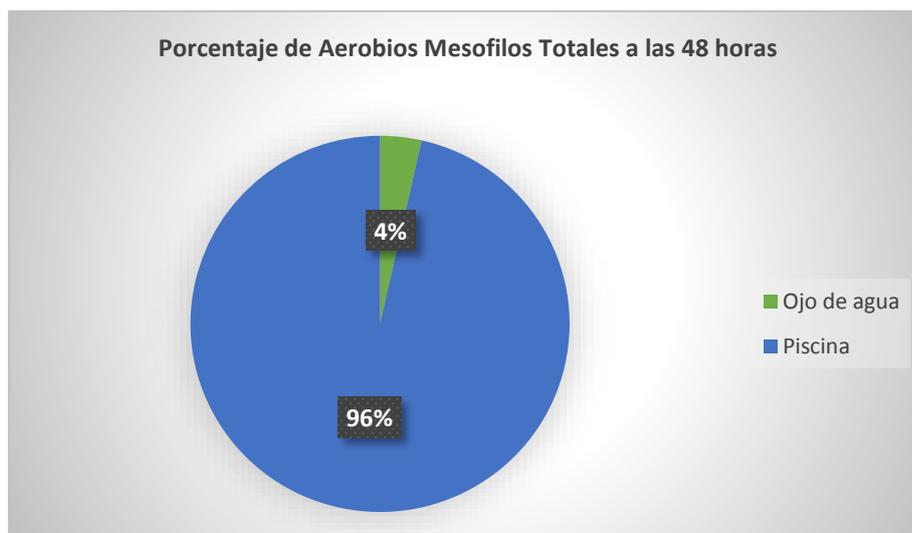
3.2 Aerobios Mesófilos Totales

Tabla 2-3: Recuento de Aerobios Mesófilos Totales (ufc/ml)

ORIGEN	Muestra 1	Muestra 2	Media (\bar{X})	Varianza (σ^2)	Desviación estándar (s)
Ojo de agua	3×10	3×10	3×10	0	0
Piscina	9×10^1	$7,4 \times 10^1$	8.2×10^1	128	11,3137
PROMEDIO DEL BALNEARIO			$4,25 \times 10^1$	64	5,65685

Fuente: NÚÑEZ, S., 2015

Gráfico 1-3: Recuento de Aerobios Mesófilos Totales del Balneario “El Salado”



Fuente: NÚÑEZ, S., 2015

En el gráfico podemos observar que en el ojo de agua el porcentaje de bacterias aerobias mesófilas es de 3×10 ufc/mL (4%), siendo inferiores a 10 ufc/mL, lo cual indica que este sitio posee un correcto perímetro de protección, además por su alta mineralización y elevada temperatura (54°C), inhibe el crecimiento de algunos microorganismos.

En el 2002, Mosso, M. A; Sánchez, M. C; De la Rosa, M. C, en el estudio de la microbiología del agua mineromedicinal de los Balnearios de Alhama de Granada, el número de bacterias heterótrofas aerobias viables y esporuladas ha sido inferior a 100 ufc/mL. Estos valores son altos a los obtenidos en el Balneario “El Salado” ya que se reportaron valores promedio de 43 ufc/mL. Siendo estos menores de 50 ufc/mL, por lo tanto están dentro de los valores establecidos en las normas.

De la Rosa, Ma. Carmen [et al], en el 2004, realizó el estudio de la microbiología del agua mineromedicinal de los Balnearios de Jaraba, donde obtiene valores inferiores de 10 ufc/mL, de bacterias heterótrofas aerobias viables, mostrando que el perímetro de protección de los manatales es el adecuado. Estos valores son bajos comparados con los del Balneario “El Salado”, que promedian valores de 43 ufc/mL, estas cifras estarían dentro de lo establecido en las normas.

En el 2006, Mosso, Ma. Ángeles [et al] realizó el estudio de la microbiología del agua mineromedicinal del Balneario Cervantes, donde el número de bacterias heterótrofas y oligotróficas aerobias viables, fueron menores de 100 ufc/mL y el de esporuladas inferior a 5 ufc/mL.

Estos valores son semejantes a los del Balneario “El Salado” de aguas sulfatadas y de extremadamente duras, indicándonos que estas cifras están dentro de lo establecido en normas e indica que los acuíferos poseen una muy buena protección.

De la Rosa, Ma. Carmen [et al], en el 2007, en la microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario Puente Viesgo detectan valores inferiores a 10 ufc/mL de bacterias heterótrofas y oligotróficas aerobias viable y esporuladas, lo que muestra una buena protección del manantial.

Los valores obtenidos de bacterias heterótrofas y oligotróficas aerobias viables son bajos a los reportados en el Balneario “El Salado”, que fueron inferiores de 100 ufc/mL, en cambio en los valores de bacterias esporuladas reportaron 10 ufc/mL, siendo este valor mayor a los 5 ufc/mL del Balneario “El Salado”, de modo que nos muestra que estas cifras están dentro de lo establecido en las normas.

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 100 ufc/mL, y el de bacterias esporuladas inferior a 5 ufc/mL.

Lo que indica que, actualmente, la protección de los manantiales es apropiada. Estos valores al cotejar con los encontrados en el Balneario “El Salado” son semejantes, además de que el pH de estas aguas es similar y están dentro de los valores establecidos en normas.

De la Rosa, Ma. Carmen [et al], en el 2009, estudia la microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario de Alicún de las Torres, revelando que en el punto de emergencia de los manantiales, el número de bacterias heterótrofas y oligotrofas aerobias viables ha sido inferior a 100 ufc/mL.

Lo que expresa que la protección de los manantiales es correcta. Estos valores conseguidos se asemejan a los reportados en el Balneario “El Salado” en aguas extremadamente duras y sulfatadas, indicándonos que estas cifras están dentro de los valores establecidos en normas.

Mosso, Ma. Ángeles y De la Rosa, Ma. Carmen, en el 2011, estudiaron la microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario de Baños de la Concepción de Villatoya, demostrando que en el punto de emergencia de los tres manantiales, el número de bacterias heterótrofas y oligotrofas aerobias viables ha sido muy bajo, inferior a 20 ufc/mL, es decir, que la protección de los manantiales es apropiada.

Estos valores son mínimos a los obtenidos en el Balneario “El Salado”, ya que están en 43 ufc/mL, aunque sean aguas extremadamente duras, indicándonos que estas cifras están dentro de los reportes establecidos en las normas.

En el 2013, De la Rosa, Ma. Carmen [et al], estudió la microbiología del agua mineromedicinal del Balneario Raposo, indicando que en el punto de emergencia del manantial, el número de bacterias heterótrofas y esporuladas es muy bajo (5 ufc/mL), es decir, la protección del manantial es la adecuada.

Estos valores son menores al comparar con los resultados promedio de 43 ufc/mL del Balneario “El Salado” de aguas extremadamente duras y sulfatadas, indicándonos que estas cifras están dentro de los rangos establecidos en las normas.

3.3 *Escherichia coli* y Coliformes Totales

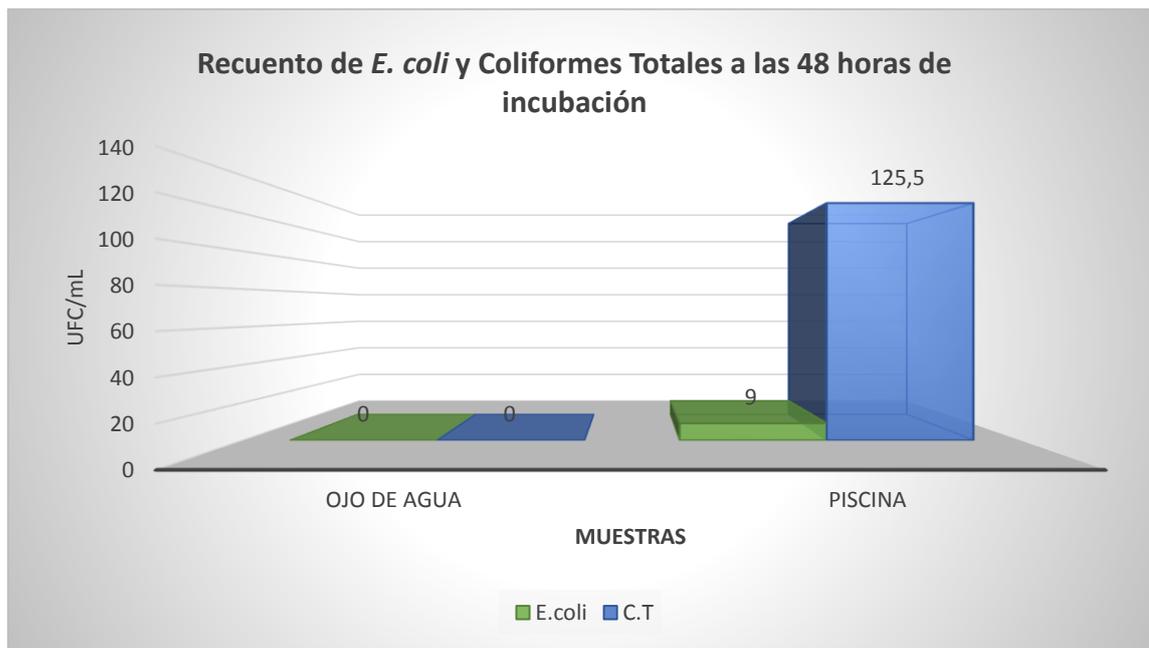
Tabla 3-3: Recuento de *Escherichia coli* y Coliformes Totales (ufc/ml)

ORIGEN	Muestra 1		Muestra 2		Media (\bar{X})		Varianza (σ^2)		Desviación estándar (s)	
	<i>E.coli</i>	C.T	<i>E.coli</i>	C.T	<i>E.coli</i>	C.T	<i>E.coli</i>	C.T	<i>E.coli</i>	C.T
Ojo de agua	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Piscina	7x10	1,31x10 ²	11x10	1.2x10 ²	9x10	1,255x10 ²	8	60,5	2,8284	7,7782
PROMEDIO DEL BALNEARIO					4,5x10	6,275x10¹	4	30,25	1,4142	3,8891

Fuente: NÚÑEZ, S., 2015

CT: coliformes totales

Gráfico 2-3: Recuento de *Escherichia coli* y Coliformes Totales del Balneario “El Salado”.



Fuente: NÚÑEZ, S., 2015

Este gráfico representa la ausencia de recuentos de coliformes totales e indicadores fecales (*Escherichia coli*), en el ojo de agua del Balneario “El Salado”, además la piscina investigada del Balneario “El Salado” evidenció la presencia de coliformes totales en un promedio $\geq 1,255 \times 10^2$ ufc/mL, estos recuentos no revelan contaminación fecal, por otro lado se reportó la presencia de microorganismos indicadores de contaminación fecal (*Escherichia coli*), en un promedio de 9×10 ufc/mL, por lo tanto existe contaminación fecal y los bañistas pueden estar expuesto a patógenos entéricos.

De la Rosa, Ma. Carmen [et al], en el 2004, realizó el estudio de la microbiología del agua mineromedicinal de los Balnearios de Jaraba, donde no reportaron indicadores fecales (*Escherichia coli*, enterococos y *Clostridium sulfito-reductores*), por lo que cumplen con la normativa de aguas de consumo humano. (BOE 45. 2003). Estos valores son similares al ojo de agua del Balneario “El Salado” donde no se evidenció indicadores fecales ni coliformes totales.

En el 2006, Mosso, Ma. Ángeles [et al] realizó el estudio de la microbiología del agua mineromedicinal del Balneario Cervantes, en los puntos de emergencia, los baños y agua de bebida de la fuente Camilo, no se encontraron indicadores fecales (*Escherichia coli*, enterococos y *Clostridium perfringens*), en 100 ml de agua, por lo que cumplen con la normativa de aguas de consumo humano.

Estos valores son similares al ojo de agua del Balneario “El Salado”, demostrando la ausencia de coliformes totales e indicadores fecales. En este estudio se detectaron además coliformes totales, en número muy bajo menos de 10/100 mL de agua, en los puntos de emergencia de este manantial. Estos valores son mínimos para los valores promedios de coliformes totales, detectados en la piscina $\leq 6,275 \times 10^1$ ufc/mL, indicando que no se debe a una contaminación fecal.

De la Rosa, Ma. Carmen [et al], en el 2007, efectuó un estudio de la microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario Puente Viesgo, no reportaron indicadores fecales (*Escherichia coli*, enterococos, *Clostridium sulfito-reductores* y *Clostridium perfringens*), en el punto de emergencia y la fuente de bebida, en 100 mL de agua, por lo que las muestras cumplen con la normativa de aguas de consumo humano. (BOE 45. 2003). Estos valores son similares a los reportados en al ojo de agua del Balneario “El Salado” e indican la contaminación fecal.

En el 2008, Mosso, Ma, Ángeles [et al], investigó la microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario de Valdelateja, donde no reportan la presencia de indicadores fecales (*Escherichia coli*, enterococos, *Clostridium sulfito-reductores* y *Clostridium perfringens*), en 100 mL de agua, de modo que las muestras cumplen con la normativa de aguas de consumo humano. (BOE 45. 2003).

Estos valores son iguales a los reportados en al ojo de agua del Balneario “El Salado”. En el manantial Rio se encontraron coliformes totales 18 ufc/mL del genero *Citrobacter freundii* y *Enterobacter amnigenus*, pero estas bacterias no indican una contaminación fecal, ni riesgo para la salud de los bañistas, tomando en cuenta la ausencia de *E. coli*.

Estos valores son bajos, con respecto a los reportados en el Balneario “El Salado”, ya que se reportó valores promedios $\geq 6,275 \times 10^1$ ufc/mL, lo cual significa que existe la posibilidad de presencia de microorganismos patógenos en el agua, debido a la presencia de *E. coli* en este mismo sitio.

De la Rosa, Ma. Carmen [et al], en el 2009, estudió la microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario de Alicún de las Torres, manifestando que en los manantiales Baños y Baños de Abajo, no presentan microorganismos indicadores de contaminación fecal (*Escherichia coli*, enterococos, *Clostridium sulfito-reductores* y *Clostridium perfringens*) en 250 mL de agua, por lo que las muestras cumplen con la normativa de aguas de consumo humano. (BOE 45. 2003).

Estos valores son similares al ojo de agua del Balneario “El Salado” donde no se evidenció indicadores fecales, ni coliformes totales, indicando que no existe ninguna contaminación de origen fecal en este lugar.

Mosso, Ma. Ángeles y De la Rosa, Ma. Carmen, en el 2011, estudiaron la microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario de Baños de la Concepción de Villatoya, expresando que en los tres manantiales estudiados, no muestran microorganismos indicadores de contaminación fecal (*Escherichia coli*, enterococos, *Clostridium sulfito-reductores* y *Clostridium perfringens*) en 100 mL de agua.

Por lo que las muestras cumplen con la normativa de aguas de consumo humano. (BOE 45. 2003). Estos valores son similares al ojo de agua del Balneario “El Salado” donde no se obtuvo indicadores fecales, ni coliformes totales, indicando que estas aguas están libres de patógenos entéricos.

En el 2013, De la Rosa, Ma. Carmen [et al], estudió la microbiología del agua mineromedicinal del Balneario Raposo, indicando que las muestras analizadas no presentan microorganismos indicadores de contaminación fecal (*Escherichia coli*, enterococos, *Clostridium sulfito-reductores* ni *Clostridium perfringens*) en 100 mL de agua, por lo que cumplen con la normativa de aguas de consumo humano. Estos valores son similares al ojo de agua del Balneario “El Salado” donde no se obtuvo indicadores fecales. Por lo tanto estas aguas no poseen contaminación fecal y están aptas para ser consumidas.

En 1998, Vendell, M, C [et al], en el estudio de microorganismos patógenos en la fuente termal de O Tinteiro en Ourense, revelan la ausencia de coliformes totales y coliformes fecales en la propia fuente de agua. Estos valores son similares a los del Balneario “El Salado”. En las inmediaciones de estas termas en el punto 2, 3, 5 y en el colector punto 4 existe la presencia de coliformes totales, también en el punto 3 y 5 de las inmediaciones y en el punto 4 del colector se evidenció la presencia de coliformes fecales.

Estos datos son similares los reportados en la piscina del Balneario “El Salado”, por la presencia de coliformes totales y coliformes fecales (*Escherichia coli*), esta última, se presume ser representativa de la carga microbiana aportada al agua por los bañistas, ya que es flora normal del sistema digestivo de la mayoría de los animales de sangre caliente y su presencia en este contexto, es relativamente benigna, pero se relacionan con los patógenos causando enfermedades diarreicas. (GARCÍA, M., et al. 2006).

En el Reglamento del régimen Técnico-Sanitario de Piscinas, Canarias Boletín Oficial de Canarias N° 38. Miércoles, 15 de marzo de 1989, exponen que el recuento de coliformes fecales debe ser nulo, por lo que los datos del Balneario “El Salado”, cumplen con la norma legal. Por lo contrario en el recuento de coliformes totales los valores máximos son de 10 coliformes totales/ 100 mL, en una piscina normal, los valores reportados en la piscina termal del Balneario “El Salado” superan los límites establecidos en este reglamento.

\

Lo que indica que en la piscina existe una contaminación originada por microorganismos del ambiente y pueden causar problemas en la salud debido a que existe el recuento de 9 ufc/mL de *E. coli*.

Por lo tanto *Escherichia coli*, en el agua, no es peligrosa por sí misma, sino que se utiliza como un indicador fiable para otros microorganismos patógenos, que se localizan usualmente en las aguas contaminadas con heces. De modo que los coliformes fecales producen impactos ambientales, por la disminución de los niveles de oxígeno, reduciendo una gama de bacterias beneficiosas.

De la misma forma afectan a la salud de las personas, por contener además parásitos, bacterias y virus causando enfermedades agudas del oído, hasta otras como la fiebre tifoidea y la hepatitis. (GARCÍA, M., et al. 2006)

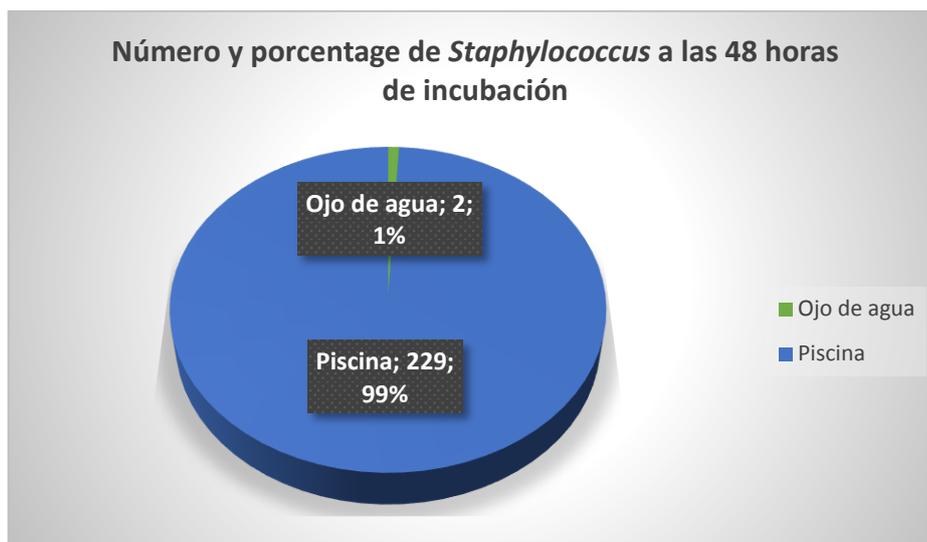
3.4 Staph Express (*Staphylococcus aureus*)

Tabla 4-3: Recuento de bacterias del genero *Staphylococcus* (ufc/ml)

ORIGEN	Muestra 1	Muestra 2	Media (\bar{X})	Varianza (σ^2)	Desviación estándar (s)
Ojo de agua	1x10	3x10	2x10	2	1,4142
Piscina	2,02x10 ²	2,56 x10 ²	2,29 x10 ²	1458	38,1838
PROMEDIO DEL BALNEARIO			1,155 x10²	730	19,7993

Fuente: NÚÑEZ, S., 2015

Gráfico 3-3: Recuento de *Staphylococcus* del Balneario “El Salado”



Fuente: NÚÑEZ, S., 2015

Esta gráfica muestra el recuento de microorganismos del género *Staphylococcus* en el ojo de agua con un promedio de 2×10 ufc/mL y en la piscina los recuentos fueron valores promedios $\geq 2,29 \times 10^2$ ufc/mL. De las especies aisladas del género *Staphylococcus* 4 ufc corresponden a *Staphylococcus aureus*, por lo que esta especie es resistente a ambientes acuáticos, capaz de sobrevivir durante largos períodos, pero no es capaz de crecer en agua., ya que su reservorio son los humanos. (OMS. 2000).

En 1998, Vendrell [et al], en el estudio de microorganismos patógenos en la fuente termal de O Tinteiro en Ourense, reportan en las inmediaciones en el punto 3 la presencia de *Staphylococcus aureus*, donde concluyen que ningún punto de los investigados se puede considerar agua potable, pues en todos los puntos aparecen al menos uno de los microorganismos prohibidos por la legislación para ser considerada agua en buen estado microbiológico.

Estos datos al comparar con los resultados promedio $\geq 2,29 \times 10^2$ de la piscina del Balneario “El Salado” son similares, puesto que del total de cepas aisladas 4 colonias son de la especie *Staphylococcus aureus*, lo que indican que los bañistas puede estar en contacto con secreción purulenta de las lesiones o que son portadores asintomáticos de *Staphylococcus aureus*.

De la Rosa, Ma. Carmen [et al], en el 2004, realizó el estudio de la microbiología del agua mineromedicinal de los Balnearios de Jaraba, de modo no reportaron bacterias patógenas (*Staphylococcus aureus*), sin embargo reportaron bajos contajes de bacterias del género *Staphylococcus*, indicando que estas bacterias se encuentran en el ambiente y llegan a los manantiales a través del aire, el suelo y la lluvia.

Estos valores son altos al comparar con los resultados del ojo de agua del Balneario “El Salado” con 2×10^4 ufc/mL, pero son bajos al comparar con los resultados promedio $\geq 2,29 \times 10^2$ de la piscina del Balneario “El Salado”. Los recuentos de *Staphylococcus aureus* en la piscina señalan que esta bacteria pudo ser liberada desde la piel de los trabajadores que no usan un equipo de protección personal adecuado.

En el 2006, Mosso, Ma. Ángeles [et al] realizó el estudio de la microbiología del agua mineromedicinal del Balneario Cervantes, reportaron en baja proporción bacterias del género *Staphylococcus*, que se encuentran en el ambiente y llegan a los manantiales a través del aire, el suelo y la lluvia. Además en una muestra reportaron bacterias patógenas (*Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila* y *Staphylococcus aureus*), en 250 mL de agua.

Estos valores son altos al comparar con los resultados del ojo de agua del Balneario “El Salado” con un promedio de 2×10^4 ufc/mL, pero son bajos al contrastar con los resultados promedio $\geq 2,29 \times 10^2$ de la piscina del Balneario “El Salado”, indicando que los bañistas tuvieron una higiene deficiente de las manos y proliferan por el contacto.

De la Rosa, Ma. Carmen [et al], en el 2007, en la microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario Puente Viesgo, detectan bajas proporciones de bacterias del género *Micrococcus* y *Staphylococcus*, dichas bacterias se alojan en el ambiente y llegan a los manantiales a través del aire, el suelo y la lluvia, sin embargo no se reportó bacterias patógenas (*Staphylococcus aureus*), en 250 mL de agua.

Estos valores son altos al comparar con los resultados del ojo de agua del Balneario “El Salado” con un promedio de 2×10^4 ufc/mL, pero son bajos al comparar con los resultados promedio $\geq 2,29 \times 10^2$ de la piscina del Balneario “El Salado”, ello podría conllevar una proliferación y propagación de estas bacterias ocasionando erupciones en la piel, infecciones de heridas, infecciones del tracto urinario, infecciones oculares, otitis externa y otras infecciones.

En el 2008, Mosso, Ma, Ángeles [et al], investiga la microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario de Valdelateja, donde reportan bajas proporciones de bacterias del género *Micrococcus* y *Staphylococcus*, dichas bacterias son muy ubicuas, sin embargo no se reportó bacterias patógenas (*Staphylococcus aureus*), en 250 mL de agua.

Estos valores son altos al cotejar con los resultados del ojo de agua del Balneario “El Salado” con un promedio de 2×10 ufc/mL, pero son bajos si comparamos con los resultados promedio $\geq 2,29 \times 10^2$ de la piscina del Balneario “El Salado” y significaría que los bañistas están propensos a sufrir intoxicaciones por las toxinas producidas por *Staphylococcus aureus*, si beben agua de la piscina.

De la Rosa, Ma. Carmen [et al], en el 2009, estudia la microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario de Alicún de las Torres, revelando una baja proporción y corresponden a los géneros *Kocuria* y *Staphylococcus*, estas bacterias son muy ubicuas y consiguen vivir en concentraciones más o menos elevadas de sales por lo que se han detectado en aguas mineromedicinales, su presencia es normal en este tipo de ambientes salinos.

No se reportaron bacterias patógenas (*Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila* y *Staphylococcus aureus*) en 250 mL de agua. Estos valores son altos al medir con los resultados del ojo de agua del Balneario “El Salado” con un promedio de 2×10 ufc/mL, pero son bajos al comparar con los resultados promedio $\geq 2,29 \times 10^2$ en la piscina del Balneario “El Salado”, lo cual podría causar enfermedades gastrointestinales causadas por una enterotoxina estafilocócica, que serán evidentes hasta 48 h después del contacto.

Mosso, Ma. Ángeles y De la Rosa, Ma. Carmen, en el 2011, estudiaron la microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario de Baños de la Concepción de Villatoya, indicando una baja proporción y corresponden al género *Staphylococcus*, estas cepas son halófilas facultativas y pueden vivir en concentraciones elevadas de sal, siendo bacterias ubicuas que se han detectado en mineromedicinales. Tampoco se han encontrado bacterias patógenas (*Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila* y *Staphylococcus aureus*) en 250 mL de agua.

Estos valores son altos al medir con los resultados del ojo de agua del Balneario “El Salado” con un promedio de 2×10 ufc/mL, pero son bajos al comparar con los resultados promedio $\geq 2,29 \times 10^2$ en la piscina del Balneario “El Salado”, e indican una falta de desinfección en el momento de limpiar la piscina.

En el 2013, De la Rosa, Ma. Carmen [et al], estudiaron la microbiología del agua mineromedicinal del Balneario Raposo, indicando que existe una baja proporción y corresponden al género *Staphylococcus*. Las cepas aisladas son halófilas facultativas y pueden vivir en concentraciones elevadas de sal. Tampoco se han encontrado bacterias patógenas (*Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila* y *Staphylococcus aureus*) en 250 mL de agua.

Estas bacterias son muy ubicuas y se han detectado en aguas mineromedicinales. Estos valores son altos al medir con los resultados del ojo de agua del Balneario “El Salado” con un promedio de 2×10^1 ufc/mL, en cambio son bajos al comparar con los resultados promedio $\leq 2,29 \times 10^2$ en la piscina del Balneario “El Salado”, indicando que la fuente es la piel de los bañistas adquieren esta bacteria a través del contacto y pueden intoxicarse al ingerir agua que contiene toxinas de *Staphylococcus aureus*.

Por todo lo mencionado anteriormente los *Staphylococcus* sobreviven durante semanas en medioambientes de concentraciones salinas, tejidos, órganos de animales y durante días en la piel y suelo. (GRACÍA, M., et al. 2006).

La especie *Staphylococcus aureus* causa varias afecciones en las mucosas relacionadas con el baño: conjuntivitis, otitis, problemas cutáneos e intoxicaciones, por ser un agente patógeno de alto grado, y que los seres humanos son el único reservorio conocido. (OMS, 2000)

3.5 Mohos y Levaduras

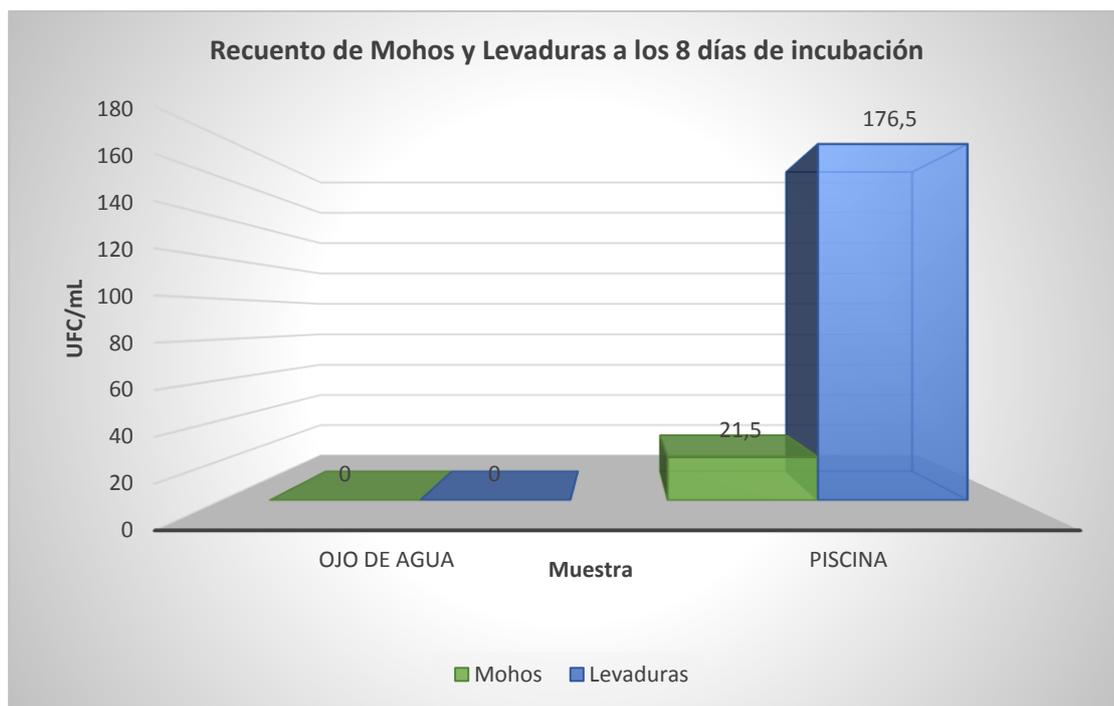
Tabla 5-3: Recuento de mohos y levaduras (ufc/ml)

ORIGEN	Muestra 1		Muestra 2		Media (\bar{X})		Varianza (σ^2)		Desviación estándar (s)	
	Mohos	L	Mohos	L	Mohos	L	Mohos	L	Mohos	L
Ojo de agua	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Piscina	$2,3 \times 10^1$	$1,64 \times 10^2$	$2,0 \times 10^1$	$1,89 \times 10^2$	$2,15 \times 10^1$	$1,765 \times 10^2$	4,5	312,5	2,1213	17,68
PROMEDIO DEL BALNEARIO					$1,075 \times 10^1$	$8,825 \times 10^1$	2,25	156,25	1,0606	8,84

Fuente: NÚÑEZ, S., 2015

L: levaduras

Gráfico 4-3: Recuento de Mohos y Levaduras del Balneario “El Salado”



Fuente: NÚÑEZ, S., 2015

En esta gráfica se revela la ausencia de mohos y levaduras en el ojo de agua. La piscina del Balneario “El Salado” revela la presencia numerosa de mohos y levaduras, en un promedio de $2,15 \times 10^1$ ufc/mL y $1,765 \times 10^2$ ufc/mL respectivamente. Ello podría causar en los bañistas micosis, reacciones alérgicas y problemas respiratorios, debido a que se propagan con mucha facilidad.

De la Rosa, Ma. Carmen [et al], en el 2004, realizó el estudio de la microbiología del agua mineromedicinal de los Balnearios de Jaraba, detectaron hongos en valores ≥ 10 en 100mL y detectaron dos cepas de levaduras en los manantiales del Balneario La Virgen.

Estos valores son bajos al medir con los resultados de mohos y levaduras de la piscina del Balneario “El Salado” con un promedio de $2,15 \times 10^1$ y $1,765 \times 10^2$ respectivamente, estos valores representan una mayor posibilidad de contraer micosis, en las zonas húmedas del cuerpo especialmente entre los dedos de los pies.

En el 2006, Mosso, Ma. Ángeles [et al] realizó el estudio de la microbiología del agua mineromedicinal del Balneario Cervantes, reportaron un número muy pequeño 20/100 mL siendo los hongos microorganismos ubicuos pero en aguas subterráneas están en número bajo o no se detectan, sin embargo en algunos estudios encontraron hongos en manantiales de aguas hipertermales por De la Rosa, M.C, Mosso, M.A, Prieto, M.P, (2011), en el Balneario “El Paraiso” de Manzanera y MOSSO, M.A, De la Rosa, M.C, Vivar, C (1998), en el Balneario de Cofrentes.

Estos valores son bajos al medir con los resultados promedio de mohos $2,15 \times 10^1$ y de levaduras $1,765 \times 10^2$ en la piscina del Balneario “El Salado”, ello podría originar una sensibilidad o alergia cuando existe contacto con piel.

De la Rosa, Ma. Carmen [et al], en el 2007, en la microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario Puente Viesgo, se detecta en escaso número, son poco frecuentes debido a su bajo número. Estos valores son bajos al medir con los resultados de mohos y levaduras de la piscina del Balneario “El Salado” con un promedio de $2,15 \times 10^1$ y $1,765 \times 10^2$ respectivamente, lo cual podría causar tiñas en las plantas de pies, uñas, espacios interdigitales.

En el 2008, Mosso, Ma, Ángeles [et al], investiga la microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario de Valdelateja, donde reportan un escaso número, son poco frecuente debido a su bajo número, hoy en día existe un gran interés por conocer la ecología de los hongos en aguas minerales envasadas (**CABRAL, J. 2010**).

Además por las implicaciones sanitarias como por las alteraciones organolépticas que pueden ocasionar en las aguas de bebida. Estos valores son bajos al medir con los resultados de mohos y levaduras de la piscina del Balneario “El Salado” con un promedio de $2,15 \times 10^1$ y $1,765 \times 10^2$ respectivamente y significa que el usuarios está expuesto a molestias como congestión nasal, irritación de la garganta, ojos, o, en ciertos casos, irritación de la piel.

De la Rosa, Ma. Carmen [et al], en el 2009, estudiaron la microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario de Alicún de las Torres, revelando hongos filamentosos en el manantial Baños de Abajo que proceden del suelo. La presencia de mohos en aguas minerales es poco frecuente. Estos valores son bajos al medir con los resultados de mohos y levaduras de la piscina del Balneario “El Salado” con un promedio de $2,15 \times 10^1$ y $1,765 \times 10^2$ respectivamente, lo cual podría causar infecciones peligrosas de moho en los pulmones de personas con un sistema inmunológico disminuido o personas con enfermedades crónicas de los pulmones.

Mosso, Ma. Ángeles y De la Rosa, Ma. Carmen, en el 2011, estudiaron la microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario de Baños de la Concepción de Villatoya, indicando la presencia de mohos y levaduras en aguas minerales es poco usual ya que provienen del suelo pero se adaptan a las condiciones de estos hábitats. Estos valores son bajos al medir con los resultados de la piscina del Balneario “El Salado” con un promedio de $2,15 \times 10^1$ para mohos y $1,765 \times 10^2$ para levaduras, lo cual estas aguas termales presentan condiciones de humedad y calor óptimas para que se desarrollen mohos y levaduras.

En el 2013, De la Rosa, Ma. Carmen [et al], estudiaron la microbiología del agua mineromedicinal del Balneario Raposo, indicando la presencia de mohos en aguas minerales es poco habitual, ya que la mayoría derivan del suelo pero se adaptan a las condiciones de estos ambientes acuáticos.

Estos valores son bajos al medir con los resultados de mohos y levaduras de la piscina del Balneario “El Salado” con un promedio de $2,15 \times 10^1$ y $1,765 \times 10^2$ respectivamente, lo cual conlleva a que si el bañista ingiere agua termal de la piscina, las toxinas de ciertos tipos de hongos pueden ser liberadas dentro de tejidos humanos.

Por lo tanto los mohos y levaduras revelan un riesgo potencial de contaminación en los balnearios de aguas termales por ello las personas deben conservar siempre la piel seca y evitar caminar descalzos por ambientes húmedos para no originar micosis a través de la piel.

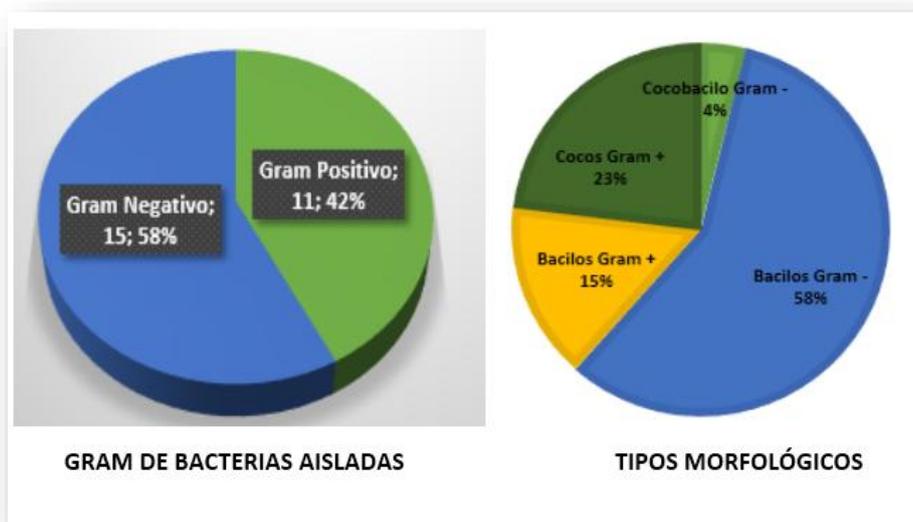
3.6 Bacterias Gram Positivas y Gram Negativas del Balneario “El Salado”

Tabla 6-3: Resultados de la Tinción Gram de Cepas aisladas

	Morfologías bacterianas			TOTAL
	Cocobacilo	Bacilos	Cocos	
Gram Positivos	1	4	6	11
Gram Negativos	0	15	0	15

Fuente: NÚÑEZ, S., 2015

Gráfico 5-3: Bacterias Gram Positivas, Gram Negativas y tipos morfológicos



Fuente: NÚÑEZ, S., 2015

Se aislaron 26 cepas de bacterias aerobias mesófilas de las cuales 19 (73,08%) fueron identificadas, correspondiendo a morfologías bacterianas de bacilos Gram negativos 10 (52,63%), cocos Gram positivos 5 (26,31%) y bacilos Gram positivos 4 (21,06%).

Las cepas aisladas e identificadas pertenecen, en su mayoría a la Familia *Enterobacteriaceae* (75%), seguido de los cocos Gram positivos de la especie *Staphylococcus aureus* (17,4%) y *Staphylococcus spp* (11,6%). De los bacilos Gram positivos aislados e identificados corresponden al género *Bacillus spp* (24%). En el Balneario “El Salado”, los datos de la Tabla 6-3 revelan el predominio de bacilos Gram negativos.

En el 2002, Mosso, M. A; Sánchez, M. C; De la Rosa, M. C, en el estudio de la microbiología del agua mineromedicinal de los Balnearios de Alhama de Granada, reportan el aislamiento de cepas bacterianas correspondiendo a bacilos Gram positivos (49,1%), cocos Gram positivos (30,2%) y bacilos Gram negativos (20,7%), predominando los géneros *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas* y *Stenotrophomonas*.

Estos datos al comparar con los del Balneario “El Salado”, son diferentes, de modo que en este lugar, predominan los bacilos Gram negativos (52,63%), en cuanto a los géneros son similares, predominando el género *Staphylococcus*, *Bacillu* y *Pseudomonas*, todo ello significa que estas bacterias son de importancia clínica ya que 20 especies de las *Enterobacteriaceae* son los causantes del 95% de las infecciones en humanos (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosas*).

De la Rosa, Ma. Carmen [et al], en el 2004, realizó el estudio de la microbiología del agua mineromedicinal de los Balnearios de Jaraba, aislaron 254 cepas bacterianas heterótrofas de las cuales 244 (96,1%) fueron identificadas, correspondiendo a bacilos Gram negativos 165 (65%), cocos Gram positivos 44 (17,3%) y bacilos Gram positivos 35 (13,8%). En todos los manantiales han predominado los bacilos Gram negativos. Los géneros predominantes de bacilos Gram negativos son *Pseudomonas* fluorescentes y no fluorescentes, *Burkholderia*, *Enterobacter* y cocos Gram positivos son *Staphylococcus*.

Estos datos al cotejar con los del Balneario “El Salado”, son similares, debido a que en este lugar, predominan los bacilos Gram negativos (52,63%), pero difieren en los géneros identificados. Estos datos revelan que los bacilos Gram negativos están ampliamente distribuidos en la naturaleza (suelo, agua), llegan a los manantiales por medio del aire o lluvias y en algunos casos de la flora de los bañistas.

En el 2006, Mosso, Ma. Ángeles [et al] realizó el estudio de la microbiología del agua mineromedicinal del Balneario Cervantes, aislaron 75 cepas bacterianas heterótrofas de las cuales 71 fueron identificadas, correspondiendo a bacilos Gram negativos 42 (56%), cocos Gram positivos 11 (14,6%) y bacilos Gram positivos 18 (24%). En los manantiales han predominado los bacilos Gram negativos, encontrándose especies fermentadoras y no fermentadoras, característica de aguas minerales hipotermas.

Estos datos al comparar con los del Balneario “El Salado”, son similares, debido a que en este lugar, predominan los bacilos Gram negativos (52,63%), pero son diferentes en cuanto a porcentajes de modo que los bacilos Gram negativos (52,63%), y cocos Gram positivos (21,06%) y bacilos Gram positivos (21,6%). Por lo tanto la morfología de bacilos Gram negativos es la predominante en ambos balnearios. Estos datos reflejan que estas bacterias proceden del aire y suelo a través de lluvias y en algunos casos de la flora de los bañistas.

De la Rosa, Ma. Carmen [et al], en el 2007, en la microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario Puente Viesgo, aisló 37 cepas bacterianas heterótrofas que corresponden a los tipos morfológicos de bacilos Gram negativos no fermentadores (62,2%), cocos y bacilos Gram positivos (18,9%). Los datos reportados en el Balneario “El Salado” son similares, debido a que en este lugar, predominan los bacilos Gram negativos (52,63%), pero difieren en la oxidación y fermentación debido a que estos en su totalidad fueron inertes.

En cuanto a los géneros encontrados en el Balneario Puente Viesgo son similares a los del Balneario “El Salado” ya que se identificaron géneros como: *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Staphylococcus*. El género *Bacillus* procede del suelo y atraviesa al agua y son frecuentes en manantiales hipertermales.

En el 2008, Mosso, Ma, Ángeles [et al], investiga la microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario de Valdelateja, donde aislaron 114 cepas de bacterias viables heterótrofas y oligotrofas, de las cuales han sido identificadas un 83,3%, que corresponden a los tipos morfológicos de bacilos Gram negativos fermentadores (45,6%) y no fermentadores (31,6%), bacilos y cocos Gram positivos (22,8%).

Los datos obtenidos en el Balneario “El Salado” son similares, debido a que en este lugar, predominan los bacilos Gram negativos (52,63%), pero son diferentes en la oxidación y fermentación debido a que estos en su totalidad fueron inertes, en cuanto a los cocos Gram positivos 5 (26,31%) el porcentaje está cercano. En cuanto a los géneros se asemejan por aislar algunos generos de la familia de *Enterobacteriaceae* y *Bacillus*.

Estos datos significan que ciertas especies que pertenecen a los coliformes proceden del suelo y otras son nativas del agua como *Budvicia aquatica*.

De la Rosa, Ma. Carmen [et al], en el 2009, estudiaron la microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario de Alicún de las Torres, indicando el aislamiento de 60 cepas de bacterias viables heterótrofas y oligotrofas, de las cuales han sido identificadas 55 (91,6%), corresponden a los tipos morfológicos de bacilos Gram negativos (54,5%), bacilos Gram positivos (29,1%) y cocos Gram positivos (16,4%).

Estos datos al comparar con los del Balneario “El Salado”, presentan variaciones en los porcentajes, bacilos Gram negativos (52,63%), cocos Gram positivos (26,31%) y bacilos Gram positivos (21,06%), pero de igual manera la morfología de bacilos Gram negativos es la predominante en ambos balnearios. En los géneros se asemejan los datos debido a que también se encontraron en los dos estudios especies del género *Pseudomonas* y en baja proporción a *Staphylococcus*, significando son bacterias del medio ambiente que pueden estar en el agua, suelo y expandirse en ambientes acuáticos.

Mosso, Ma. Ángeles y De la Rosa, Ma. Carmen, en el 2011, estudiaron la microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario de Baños de la Concepción de Villatoya y han aislado 135 cepas de bacterias viables heterótrofas y oligotrofas, que corresponden a los tipos morfológicos de bacilos Gram negativos (60%), bacilos Gram positivos (29,6%) y cocos Gram positivos (10,4%).

Estos datos al comparar con los del Balneario “El Salado”, son similares en el predominio de bacilo Gram negativos, pero diferentes en los porcentajes obtenidos de los tipos morfológicos, bacilos Gram negativos (52,63%), cocos Gram positivos (26,31%) y bacilos Gram positivos (21,06%).

En el 2013, De la Rosa, Ma. Carmen [et al], estudiaron la microbiología del agua mineromedicinal del Balneario Raposo y aislaron 115 cepas de bacterias viables heterótrofas y oligotrofas, que corresponden a los tipos morfológicos de bacilos Gram negativos (73 %), bacilos Gram positivos (23,5 %) y cocos Gram positivos (3,5 %).

Al comparar los porcentajes de los tipos morfológicos de estos dos balnearios, son diferentes, puesto que en Balneario “El Salado ” corresponde a bacilos Gram negativos (52,63%), bacilos Gram positivos (21,06%) y cocos Gram positivos (26,31%), Sin embargo en los dos balnearios prevalecen los bacilos Gram positivos.

3.7 Identificación de bacterias mesófilas bacilos Gram negativos

Tabla 7-3: Características culturales, fisiológicas y bioquímicas de las colonias aisladas (bacilos Gram negativos).

Códigos		OPM1-1	OPM1-3	OPM1-9	OPM1-13	OPM1-16	OPM2-21	OPM2-25	OPM2-28
ORIGEN	PLACA PETRIFILM	E.coli/CT	E.coli/ CT	Aerobios	Aerobios	E.coli/ CT	Aerobios	Aerobios	Aerobios
	DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA								
	• Forma	Irregular	Circular	Irregular	Circular	Irregular	Circular	Irregular	Irregular
	• Borde	Ondulado	Rizado	Rizado	Rizado	Rizado	Rizado	Rizado	Rizado
	• Elevación	Elevada	Plana	Elevada	Elevada	Plana	Plana	Plana	Plana
	• Superficie	Rugosa	Lisa	Lisa	Lisa	Rugosa	Rugosa	Lisa	Rugosa
	• Consistencia	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Mucoide	Cremosa	Cremosa	Mucoide
	• Luz Transmitida	Opaca	Translúcida	Translúcida	Translúcida	Opaca	Transparente	Translúcida	Translúcida
	• Color	Blanco	Blanco	Blanco	Amarillento-verdoso	Amarillento	Transparente	Amarillento	Amarillento-verdoso
	• Tamaño	6 mm	5 mm	5 mm	3 mm	14 mm	13 mm	12 mm	22 mm
TINCÓN	GRAM	Bacilos (-)	Bacilos (-)	Bacilos (-)	Bacilos (-)	Bacilos (-)	Bacilos (-)	Bacilos (-)	Bacilos (-)

(Continúa)

PRUEBAS	CATALASA	+	+	+	+	+	-	+	+
	OXIDASA	-	-	-	-	+	+	-	+
	OXIDATIVO/FERMENTATIVO	Inertes	Inertes	Inertes	Inertes	Inertes	Inertes	Inertes	Inertes
MEDIO DE CULTIVO	AGAR MACCONKEY	C	C	C	C	C	C	C	C
	AGAR EOSINA AZUL DE METILENO	C	C	C	C	C	C	C	C
	AGAR SHIGELLA-SALMONELLA	SC	SC	SC	SC	N/A	SC	C	N/A
	AGAR F	N/A	N/A	N/A	N/A	C	N/A	N/A	C
PRUEBAS BIOQUÍMICAS	KLIGLER	A/A	ALC/A	A/A	ALC/A	N/A	ALC/A	ALC/A	N/A
	• Glucosa	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	N/A	Positivo	Positivo	N/A
	• Lactosa	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	N/A	Negativo	Negativo	N/A
	• H ₂ S	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	N/A	Negativo	Negativo	N/A
	SIM								
	• Indol	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	N/A	Negativo	Positivo	N/A
	• Movilidad	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	N/A	Positivo	Positivo	N/A
	• H ₂ S	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	N/A	Negativo	Negativo	N/A
UREA	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	N/A	Negativo	Negativo	N/A	
CITRATO	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	N/A	Positivo	Negativo	N/A	
ESPECIE	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Enterobacter gergoviae</i>	<i>Budvicia aquatica</i>	<i>Cedecea davisae</i>	<i>Pseudomonas saeruginosa</i>	<i>Shewanella putrefaciens</i>	<i>Edwardsiella ictaluri</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	

Fuente: NÚÑEZ, S., 2015

OPM1: origen piscina-muestra 1, **OPM2:** origen piscina-muestra 2, **CT:** Coliformes Totales, **mm:** milímetros, **C:** crecimiento, **SC:** sin crecimiento, **A/A:** Ácido/ácido, **ALC/A:** alcalino/ácido, **N/A:** no aplica

Esta tabla muestra las características generales, fisiológicas y bioquímicas de la Familia *Enterobacteriaceae*, donde se observan que son bacilos Gram negativos rectos, no formadores de esporas, catalasa variable, pero en su mayoría son positivos, de movilidad variable, que por lo general son móviles. Además son oxidasa negativa, O/F de la glucosa: F (fermentativos) o F y O (oxidativos), pero en este caso la mayoría fueron inertes. Su temperatura óptima de crecimiento fue de 35°C. Y con un crecimiento en Agar MacConkey y Eosina azul de metileno. (MACFADDIN, Jean, 2000. p. 681).

Por otro lado las características el género *Pseudomonas* son bacilos Gram negativos rectos o ligeramente curvos, aerobios, catalasa positivos, movilidad variable, pero por lo general son positivos, oxidasa variable, O/F de la glucosa: O (oxidativos), pero en nuestro caso estos fueron inertes. La temperatura de crecimiento óptima fue de 30-37°C. (MACFADDIN, Jean, 2000. p. 628).

De la Rosa, Ma. Carmen [et al], en el 2004, realizó el estudio de la microbiología del agua mineromedicinal de los Balnearios de Jaraba, en el manantial Las Pilas aisló la especie de *Pseudomonas aeruginosa* (13%) y en el manantial S. José con un (18,6%), estos resultados son mayores al comparar con los obtenidos en el Balneario “El Salado” de la especie de *Pseudomonas aeruginosa* (10,53%), lo cual indica que esta bacteria sobrevive y proliferarse en ambientes oligotróficos.

En el 2008, Mosso, Ma, Ángeles [et al], investiga la microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario de Valdelateja, en el total de bacterias aisladas reporta a *Budvicia aquatica* (2,6%), y en el Balneario “El Salado” se reporta *Budvicia aquatica* (5,26%), estos datos significan que esta bacteria es propia de la flora del agua y no causa ningún riesgo en los bañistas.

En el 2013, De la Rosa, Ma. Carmen [et al], estudió la microbiología del agua mineromedicinal del Balneario Raposo, en el análisis del Sondeo se reportó la especie *Budvicia aquatica* (6,7%) y en el Balneario “El Salado” se reporta *Budvicia aquatica* (5,26%), ello podría decirse que estas bacteria son propia de la flora del agua y no causa ningún riesgo en los bañistas.

3.8 Identificación de bacterias mesófilas bacilos Gram positivos

Tabla 8-3: Características culturales, fisiológicas y bioquímicas de las colonias aisladas bacilos Gram positivos

	CÓDIGOS	OOM2-29	OOM2-31	OOM2-33	OOM1-35
ORIGEN	PLACA PETRIFILM	Staph Express	Staph Express	Staph Express	Aerobios
DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA	• Forma	Irregular	Circular	Irregular	Circular
	• Borde	Rizado	Circular	Rizado	Rizado
	• Elevación	Plana	Plana	Elevada	Elevada
	• Superficie	Lisa Brillante	Lisa brillante	Lisa brillante	Rugosa
	• Consistencia	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa
	• Luz Transmitida	Translúcida	Translúcida	Translúcida	Opaca
	• Color	Abano	Amarillo	Transparente	Tomate
	• Tamaño	6 mm	8 mm	4mm	3 mm
TINCIÓN	GRAM	Bacilos (+)	Bacilos (+)	Bacilos (+)	Bacilos (+)
PRUEBAS	CATALASA	+	+	+	+
	OXIDASA	-	-	-	-
OTRAS REACCIONES	HIDRÓLISIS DEL ALMIDÓN	+	+	+	-
	HIDRÓLISIS DE LA GELATINA	-	+	-	+
	ESPECIE	<i>Bacillus spp</i>	<i>Bacillus spp</i>	<i>Bacillus spp</i>	<i>Bacillus spp</i>

Fuente: NÚÑEZ, S., 2015

OOM1: origen ojo de agua-muestra 1, **OOM2:** origen ojo de agua-muestra 2, **mm:** milímetros

La Tabla 8-3 muestra las características generales, fisiológicas y bioquímicas del género *Bacillus* y de la especie *Bacillus* spp, se observan que son bacilos Gram positivos rectos, catalasa variable, pero en su mayoría son positivos, movilidad por lo general positiva. Además son oxidasa variables, O/F de la glucosa: F (fermentativos) u O (oxidativos) o ambos (F/O) Su temperatura óptima de crecimiento fue de 35 ° C. (MACFADDIN, J. 2000) Se realizaron pruebas de hidrólisis del almidón e hidrólisis de la gelatina, observando resultados positivos.

En el 2006, Mosso, Ma. Ángeles [et al] realizó el estudio de la microbiología del agua mineromedicinal del Balneario Cervantes, aisló cepas de *Bacillus*, semejantes a las aisladas en el Balneario “El Salado”, de modo que estas bacterias proceden del aire y del suelo de donde atraviesan al agua y no poseen consecuencias clínicas.

De la Rosa, Ma. Carmen [et al], en el 2007, en la microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario Puente Viesgo, aisló bacilos Gram positivos del genero *Bacillus*, similares a los aislados en el Balneario “El Salado”, indicándonos que estas bacterias proceden del suelo y atraviesan al agua.

Del mismo modo en el 2007, Márquez Francisco, realizó el aislamiento y taxonomía de bacterias del género *Bacillus* recolectadas en suelos de un bosque y una pradera, Al comparar con nuestra investigación, lo que significa que la fuente y prevalencia de esta bacteria son ambientes naturales como el suelo y el agua, gracias a sus endosporas, pueden adaptarse a diferentes hábitats y poder desarrollarse.

Mosso, Ma. Ángeles y De la Rosa, Ma. Carmen, en el 2011, estudiaron la microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario de Baños de la Concepción de Villatoya, aislaron especies de *Bacillus* 4,8% en Las Bombas y 17,9% en las Cuevas, al comparar con los valores obtenidos en el Balneario “El Salado” de *Bacillus* spp (21,06%) son bajos, lo que significa que estas bacterias son provenientes de las capas superiores del suelo y no causan daño a la salud de los bañistas.

En el 2013, De la Rosa, Ma. Carmen [et al], estudió la microbiología del agua mineromedicinal del Balneario Raposo, aislaron especies de *Bacillus* spp en el manantial con un 8,6% y en el Sondeo con un 13,3%, al comparar con los valores obtenidos en el Balneario “El Salado” de *Bacillus* spp (21,06%) son bajos, por lo que significa que estas bacterias son provenientes de las capas superiores del suelo.

3.9 Identificación de bacterias mesófilas cocos Gram positivos

Tabla 9-3: Resultados de Cepas aisladas Cocos Gram positivos

PRUEBAS	NUMERACIÓN DE COLONIAS				
	OOM1-30	OPM1-3	OPM1-16	OPM2-30	OPM1-32
EXTRAÍDA DE PLACA	Staph Express	Aerobios	Staph Express	Staph Express	Aerobios
DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA:					
• Forma	Puntiforme	Irregular	Circular	Irregular	Circular
• Borde	Ondulada	Rizado	Circular	Rizado	Rizado
• Elevación	Plana	Plana	Plana	Elevada	Elevada
• Superficie	Lisa brillante	Lisa brillante	Lisa brillante	Lisa brillante	Rugosa
• Consistencia	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa
• Luz Transmitida	Translúcida	Translúcida	Translúcida	Translúcida	opaca
• Color	Blanca	Anaranjado pálido	Amarillo	Transparente	Tomate
• Tamaño	2 mm	5 mm	8 mm	4mm	3 mm
GRAM	Cocos (+)	Cocobacilo	Cocos (+)	Cocos (+)	Cocos (+)
CATALASA	+	+	+	+	+
OXIDASA	-	-	-	-	-
MANITOL SALADO	CNF	A	A	A	CNF
RESISTENCIA NOVOBIOCINA	-	-	-	-	-
ESPECIE	<i>Staphylococcus spp</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus spp</i>

ELABORADO POR: NÚÑEZ; 2015

OOM1: origen ojo de agua-muestra 1, **OPM1:** origen piscina-muestra 1, **OPM2:** origen piscina-muestra2, **CNF:** crecimiento, no fermentación, **mm:** milímetros, **A:** crecimiento y fermentación

La Tabla 9-3 muestra las características generales, fisiológicas y bioquímicas del género *Staphylococcus*, pertenecen a la especie *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus spp.*, se observan que son cocos Gram positivos dispuestos en parejas o racimos, coagulasa variables, aerobios catalasa por lo general positiva, oxidasa variables. Su temperatura óptima de crecimiento fue de 30-37°C. (MACFADDIN, J. 2000)

En el 2006, Mosso, Ma. Ángeles [et al] realizó el estudio de la microbiología del agua mineromedicinal del Balneario Cervantes, en el manantial Cervantes reportan la especie de *Staphylococcus spp* (2,9) y en el manantial San Camilo reportan para *Staphylococcus spp* (7,5%), al comparar los resultados obtenidos en el Balneario “El Salado” que reportan un 10,53%, este es mayor, indicando que estas bacterias habitan en el ambiente y llegan a los manantiales por medio del aire, la lluvia y el suelo.

En 1998, Vendell et al realiza el estudio de microorganismos patógenos en el fuente termal de O Tinteiro en Ourense, donde reporta la presencia de especies de *Staphylococcus aureus* en el punto 3 de las enmendaciones, estos valores son semejantes a la presencia de *Staphylococcus aureus* en la piscina del Balneario “El Salado”, lo que conlleva a un riesgo para los bañistas porque pueden generar problemas en la piel.

La especie de *Staphylococcus aureus* habita en animales y personas, en las fosas nasales, la garganta y la piel, pero también causa enfermedades, tales como neumonías. Su importancia se debe a la resistencia frente a los antibióticos y las limitadas opciones de tratamiento en salud pública.

3.10 Cepas aisladas en el Balneario “El Salado” de Baños de Agua Santa-Tungurahua

Tabla 10-3: Géneros y especies de Cepas aisladas en el Ojo de agua y en la Piscina

Origen	Muestra	Especies	Total de cepas aisladas	Porcentaje (%) de especies encontradas por muestreo	Especies encontradas en el Balneario	Porcentaje (%) de coincidencia de las pruebas	Porcentaje (%) de especies encontradas en el Balneario
OJO DE AGUA	1	Bacillus spp	1	50,00	Bacillus spp	100	21,06
		Staphylococcus spp	1	50,00	Staphylococcus spp	100	10,53
OJO DE AGUA	2	Bacillus spp	3	100,00			
PISCINA	1	Escherichia coli	1	11,11	Escherichia coli	100	10,53
		Staphylococcus aureus	3	33,34	Staphylococcus aureus	100	15,79
		Citrobacter freundii	1	11,11			
		Enterobacter freundii	1	11,11	Citrobacter freundii	100	5,26
		Budvicia aquatica	1	11,11	Enterobacter freundii	100	5,26
		Cedecea davisae	1	11,11	Budvicia aquatica	100	5,26
		Pseudomonas aeruginosa	1	11,11		100	5,26
PISCINA	2	Escherichia coli	1	12,5	Cedecea davisae		
		Edwardsiella ictaluri	1	12,5	Edwardsiella ictaluri	88	5,26
		Shewanella putrefaciens	1	12,5	Shewanella putrefaciens	99.9	5,26
		Pseudomonas aeruginosa	1	12,5			
		Edwardsiella ictaluri	1	12,5	Pseudomonas aeruginosa	100	10,53

Fuente: NÚÑEZ, S., 2015

En la Tabla 10-3 se presentan las especies aisladas e identificadas en el ojo de agua y en la piscina del Balneario “El Salado”. En el ojo de agua se aislaron dos géneros bacterianos de la especie *Bacillus spp* y *Staphylococcus spp*. La piscina de este balneario tiene una mayor diversidad presentado especies en su mayoría de la Familia *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter gergoviae*, *Budvicia aquatica*, *Cedecea davisae*, *Edwardsiella ictaluri*, identificadas por medio de pruebas bioquímicas. *Shewanella putrefaciens* (esta bacteria fue identificada por medio del método de Microgen GN-ID Idnetificacion).

También se identificaron especies de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus spp* y *Staphylococcus aureus*, provenientes de una contaminación aportada por los bañistas.

Bacillus spp son frecuentes en ambientes naturales ya sea en el agua y en el suelo, y esto se debe a la resistencia de las esporas a procesos de desinfección. Estas bacterias son inocuas, pero algunas pueden ser patógenas para animales incluido el hombre, debido a que algunas cepas producen toxinas similares a *Staphylococcus aureus*.

Escherichia coli es una parte natural y principal de la flora bacteriana en el intestino de los seres humanos y animales. La mayoría de cepas de *E. coli* no son patógenas y habitan inofensivamente el colon. Sin embargo, algunos serotipos juegan un papel en las enfermedades intestinales y extra-intestinales, como las infecciones del tracto urinario. **(CABRAL, J. 2010)**

La especie *Pseudomonas aeruginosa* es la más habitual aislada en aguas de piscina, presentando una superioridad sobre los indicadores microbiológicos. A niveles de 1,5 mg/l esta especie no se desarrolla en el agua termal, eliminando así la principal causa de otitis en los bañistas. Existen brotes de dermatitis y otitis externa por *Pseudomonas aeruginosa* asociados al uso de piscinas y bañeras calientes, y en ambientes húmedos por lo que esta bacteria es de gran importancia clínica. **(TORTORA, G. 2007)**

Citrobacter freundii es un habitante intestinal de los seres humanos que a veces pueden poseer o conseguir, la capacidad de originar una enterotoxina y convertirse así en un patógeno intestinal, causante de diarreas además puede producir infecciones de vías urinarias y de vías respiratorias. **(CABRAL, J. 2010)**

Budvicia aquatica es un microorganismo que se encuentran generalmente en el agua dulce incluyendo arroyos, ríos y pozos, sin embargo, ocasionalmente se producen en muestras clínicas. **(MAHON, C., et al. 2015).**

Shewanella putrefaciens se le ha implicado ocasionalmente como un patógeno humano, se ha aislado en muestras clínicas de humanos y se asocian a úlceras cutáneas, infecciones óticas, infecciones oculares. Sin embargo se lo recupera más frecuente en reservorios acuáticos, es de importancia ecológica ya que interviene en procesos de autodepuración ambiental porque usa compuestos orgánicos y el petróleo como fuente de energía y fuente de carbono. (KONEMAN, E., et al. 2015)

Cedecea davisae es la especie más comúnmente aislada, está relacionada con infecciones cutáneas con úlcera de la pierna y heridas de quemaduras. Se aisló de sangre de las úlceras de la pierna. (MAHON, C., et al. 2015).

Edwardsiella ictaluri es un microorganismo que se ha aislado solo en peces y en la actualidad, no posee importancia clínica. (KONEMAN, E., et al. 2015).

3.11 Antibiogramas de bacilos Gram negativos

Tabla 11-3: Antibiograma de varias especies de *Enterobacteriaceae*

Agente Antimicrobiano		Ampicilina (10 µg)	Ampicilina + Ac. clavulánico (20/10 µg)	Cefalosporinas i: Cefalotina (30 µg)	Ceftriaxona (30 µg)	Ciprofloxacino	Gentamicina (10 µg)	Imepinem (10 µg)	Trimetoprim/sulfame toxazol (1.25/23.75 µg)
Microorganismo									
1	<i>Citrobacter freundii</i>	R	R	R	S (30)	NR	S (17)	S (25)	R
3	<i>Enterobacter gergoviae</i>	S (20)	S (24)	R	S (28)	NR	S (22)	S (40)	S (25)
9	<i>Budivicia aquatica</i>	S	S	S	S	S	S (22)	S	S
13	<i>Cedecea davisae</i>	S (10)	S (19)	R	S (24)	S (30)	S (18)	NR	S (20)
21	<i>Shewanella putrefaciens</i>	S (12)I	S (24)	R	S (26)	NR	S (22)	S (38)	S (22)
25	<i>Edwardsiella ictaluri</i>	S	S	S	S (22)	NR	S (20)	S	S (24)

Fuente: NÚÑEZ, S., 2015

R: resistente, **S:** sensible **NR:** no resultados, **(#):** diámetro en mm de los halos de inhibición de antibióticos.

En la Tabla 11-3 se puede observar los resultados de antibiogramas de algunas especies donde Cefalotina (30 µg), es el antibiótico que menor efecto causa en todas las bacterias de la Familia de *Enterobacteriaceae*, por otro lado Ceftriaxona (30 µg) es el antibiótico de amplio espectro que inhibe el crecimiento de estas bacterias.

En el manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión (2002), general las Enterobacterias poseen una resistencia natural a Penicilina, Oxaciclina, Macrólidos, Clindamicina y Glicopéptidos.

Citrobacter freundii, posee una resistencia inherente a las Aminopenicilinas, Aminopenicilinas+ IBL, Cefalosporinas de primera generación y Cefuroxima, además cuando Ceftriaxona presenta un halo de inhibición muy grandes ≥ 25 , esta bacteria puede producir enzimas betalactamasas de espectro extendido, sin embargo se debe realizar pruebas confirmatorias.

Al comparar con nuestros resultados estos son similares en cuanto a resistencias. Del mismo modo KONEMAN Elmer (2015), manifiesta que *Citrobacter freundii* tiene un amplio patrón de sensibilidad a lo resistente a ampicilina y las cefasporinas de primera generación, al comparar con nuestros resultados estos fueron similares pero con la adición de una resistencia también a Ampicilina + Ac. clavulánico,

El género *Cedecea* es resistente a cefalotina, de igual manera esta resistencia se observa en la cepa *Cedecea davisae* del Balneario “El Salado”.

En un caso de la sepsis en un paciente inmunodeprimido expuestos a *B. aquatica* en agua de la inundación del huracán Katrina, *Budvicia aquatica* fue sensible a varios agentes antibióticos, y el paciente fue tratado con éxito con levofloxacino intravenosa, seguida de una dosis dos semanas ciprofloxacino oral, al cotejar con los datos de esta investigación, de igual manera es sensible a ciprofloxacino.

Shewanellas son sensibles a la mayoría de los antibióticos eficaces para Gram negativos salvo penicilina y cefalotina, al cotejar con nuestros datos estos son similares en cuanto a la resistencia de cefalotina.

El CLSI documento M100-S25 (2015), reporta resistencia de *C. freundii* a los siguientes antimicrobianos: Ampicilina, Amoxicilina + ácido clavulánico, Cefalosporinas I: Cefalotina, de igual manera las cepas de *C. freundii* aisladas en el Balneario “El Salado” son resistentes a estos antibióticos.

3.12 Antibiogramas de bacilos Gram negativos *Pseudomonas aeruginosa*

Tabla 12-3: Antibiograma de especies de *Pseudomonas aeruginosa*.

Agente antimicrobiano		Ácido nalidíxico (30 µg)	Ampicilina + Ac. clavulánico (20/10 µg)	Azitromicina (15 µg)	Ceftriaxona (30 µg)	Gentamicina (10 µg)	Imipenem (10 µg))	Trimetoprim/sulfa metoxazol (1.25/23.75 µg)	Tigeciclina (15 µg)
Microorganismo									
16	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R	S (20)	R	S (16)	-	R	S (12)
28	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R	NR	R	S (17)	S 23	R	S (15)

Fuente: NÚÑEZ, S., 2015

R: resistente, **S:** sensible **NR:** no resultados, **(#):** diámetro en mm de los halos de inhibición de antibióticos.

En el manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión (2002) manifiesta que *Pseudomonas aeruginosa* es presentan resistencias naturales a Penicilina, Ampicilina, Amoxicilina, cefalosporinas de primera y segunda generación, Cefotaxima, Ceftriaxona, Kanamicina, Tetraciclina, Cloramfenicol, Ácido Nalidíxico y Ácido Pipemídico. Al comparar los resultados de las cepas aisladas en el Balneario “El Salado” presenta igual resistencia.

KONEMAN, Elmer (2015), explica que el tratamiento de infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* es difícil, un espectro estrecho de antibióticos es eficaz e incluyen a las carboxipenicilinas (carbenicilina, ticarciclina), cefalosporinas antipseudomónicas (ceftazidima), carbapenémicos (imipenem y meropenem), quinolonas (ciprofloxacino), aminoglicosidos (gentamicina, amikacina).

En su mayoría las cepas son resistentes a penicilinas y cefalosporinas incluidas ampicilina, cefuroxima y cefotzxima. *Pseudomonas aeruginosa*, pueden portar plásmidos de multiresistencia y esta característica ha conducido a la aparición de algunas cepas resistentes a todos los antibióticos eficaces. Al comparar los resultados de las cepas aisladas en el Balneario “El Salado” presenta igual resistencia.

OSMAN, Kamelia (2012) en el estudio de Aparición de un antimicrobiano resistente *Pseudomonas aeruginosa* de humanos y animales muestras clínicas: Una zoonosis y peligro para la salud pública, explica que en brotes nosocomiales de multirresistente *Pseudomonas aeruginosa*, por lo general originada por la propagación clonal, se da a nivel mundial para diversos hospitales y pueden ser un problema emergente en pacientes ambulatorios en varias partes del mundo.

El interés particular y relevancia clínica de PER-1 BLEE es en el tratamiento de infecciones graves porque confiere resistencia a la mayoría de A-lactámicos, incluyendo aztreonam y cefalosporinas antipseudomonas nuevos (ceftazidima y cefepima), se puede llevar en un plásmido que ha sido transferida in vitro de *P. aeruginosa* positivo PER-1- a las cepas negativas-PER-1 de la misma especie. Al comparar los resultados de *P. aeruginosa* aisladas en el Balneario “El Salado” presenta igual resistencia, debido a la alta prevalencia de cepas multiresistentes.

ULLAH, Aman [et al], en el 2012, en el estudio de la Prevalencia de la resistencia a los antimicrobianos en *Pseudomonas aeruginosa* manantial de agua dulce contaminada con aguas residuales domésticas, informan que la resistencia a los antibióticos es un problema grave del mundo y flora acuática igualmente está jugando un papel importante en la transmisión de la resistencia a los antibióticos.

En la especie de *Pseudomonas aeruginosa*, se evaluó frente a 14 antimicrobianos, entre ellos el Trimetoprim/sulfametoxazol con un 84%. Al comparar con los resultados de especies de *Pseudomonas aeruginosa*, frente al Trimetoprim/sulfametoxazol es similar la resistencia. Por lo que ambos ambientes de agua logran actuar como reservorios de patógenos resistentes a los antibióticos.

El CLSI documento M100-S25 (2015), reporta resistencia de *P. aeruginosa* a los siguientes antimicrobianos: Ampicilina, Amoxicilina + ácido clavulánico, Ceftriaxona, Tigeciclina, Trimetoprim/sulfametoxazol, al comparar con las dos cepas de *P. aeruginosa* aisladas en el Balneario “El Salado”, presentan una similar resistencia a estos antimicrobianos, sin embargo, Tigeciclina es sensible y eficaz para usar en tratamientos terapéuticos.

3.13 Antibiograma de bacilos Gram positivos

Tabla 13-3: Antibiograma de algunas especies de *Bacillus spp.*

Agente antimicrobiano		Azitromicina (15 µg)	Ampicilina (10 µg)	Ciprofloxacina (5 µg)	Eritromicina (15 µg)	Gentamicina (10 µg)	Novobiocina (30 µg)	Oxaciclina (1 µg)	Penicilina G (10 U)
Microorganismo									
8	<i>Bacillus spp</i>	S (28)	S (34)	S (40)	S (30)	S (26)	S (30)	S (18)	R (26)
9	<i>Bacillus spp</i>	S (34)	S	S	S	S (26)	S	S	S
11	<i>Bacillus spp</i>	S	S	S	S	S	S	S	S
13	<i>Bacillus spp</i>	S (32)	S	S (35)	S (37)	S (26)	S (16)	R	S

Fuente: NÚÑEZ, S., 2015

R: resistente, **S:** sensible **NR:** no resultados, **(#):** diámetro en mm de los halos de inhibición de antibióticos.

FARÍA, José [et al] (2001), en el estudio de la resistencia a los antimicrobianos de especies de *Bacillus* aislados de la leche cruda, presentan algunas cepas de *Bacillus* resistentes a los Betalactámicos, Penicilina G, Oxaciclina y Amoxicilina + ácido clavulánico.

De modo que los aminoglucoósidos fueron los antimicrobianos más efectivos contra especies de *Bacillus* aislados. La presencia en la leche cruda de aislados del genero *Bacillus* resistentes a antimicrobianos, puede originar una posible transmisión al hombre de cepas resistentes bacterianas.

Al comparar con los resultados de las cepas aisladas en el Balneario “El Salado” difieren porque ciertas cepas son resistentes cuando las de este estudio son sensibles y viceversa.

La mayor parte de las cepas de *Bacillus spp* son sensibles a los antibióticos, esto se debe a que son cepas de origen ambiental.

3.14 Antibiograma de cocos Gram positivos

Tabla 14-3: Antibiograma de especies de *Staphylococcus spp*

Agente antimicrobiano		Ácido nalidíxico (30 µg)	Ampicilina (10 µg)	Cefalotina (30 µg)	Ciprofloxacina (5 µg)	Gentamicina (10 µg)	Novobiocina (30 µg)	Oxaciclina (1 µg)	Vancomicina (30 µg)
Microorganismo									
32-OJO DE AGUA	<i>Staphylococcus spp</i>	R	R (9)	S (28)	R (13)	S (20)	S (32)	S (18)	S (20)
32-PISCINA	<i>Staphylococcus spp</i>	R	S (12)	S (22)	R (9)	S (21)	S (36)	S (15)	S (18)

Fuente: NÚÑEZ, S., 2015

O: ojo de agua, **P:** piscina, **R:** resistente, **S:** sensible **NR:** no resultados, **(#):** diámetro en mm de los halos de inhibición de antibióticos.

En el manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión (2002) manifiesta que *Staphylococcus* son resistentes a ácido nalidíxico, en las cepas aisladas en el Balneario “El Salado”, de igual manera se reportaron estas resistencias.

El CLSI documento M100-S25 (2015), reporta una resistencia intrínseca a la Novobiocina las especies de *S. saprofitico*, *S. cohnii*, *S. xylosus*

3.15 Antibiograma de cocos Gram positivos (*Staphylococcus aureus*)

Tabla 15-3: Antibiograma de especies de *Staphylococcus aureus*

Agente antimicrobiano		Azitromicina (15 µg)	Clindamicina (2 µg)	Estreptomina (10 µg)	Gentamicina (10 µg)	Kanamicina (30 µg)	Oxaciclina (1 µg)	Penicilina G (10 U)	Vancomicina (30 µg)
Microorganismo									
16-P	<i>Staphylococcus aureus</i>	S (30)	S (28)	S (20)	S (17)	S (20)	S (20)	S (38)	S (17)
30-P	<i>Staphylococcus aureus</i>	S (34)	S (26)	S (21)	S (21)	S (24)	S (23)	S (39)	S (22)

Fuente: NÚÑEZ, S., 2015

O: ojo de agua, **P:** piscina, **R:** resistente, **S:** sensible **NR:** no resultados, **(#):** diámetro en mm de los halos de inhibición de antibióticos.

El CLSI documento M100-S25 (2015), reporta que *S. aureus* no presenta resistencia intrínseca en estas especies.

Staphylococcus aureus no produjo una betalactamasa la cual inactiva a Penicilina, Amoxicilina y Ampicilina.

Las cepas sensibles a meticilina suelen ser sensibles a macrólidos (azitromicina) porque no presentan una enzima que dimetila el ribosoma y evita un cambio conformacional que evita la unión a dichos antibióticos.

Las dos cepas de *Staphylococcus aureus* no poseen la enzima bifuncional (acetilasa y fosfotranferasa) ya que no afecta a los aminoglucósidos (gentamicina, estreptomicina, kanamicina).

3.16 Pruebas de detección de fenotipos de resistencia en bacterias aisladas en el Balneario “El Salado”

Tabla 16-3: Resultados de la prueba de detección de fenotipos de resistencia en bacterias aisladas en el Balneario “El Salado”

CÓDIGO	RESULTADO
<i>Citrobacter freundii</i>	Prueba negativa
<i>Enterobacter gergoviae</i>	Prueba negativa
<i>Budivicia aquatica</i>	Prueba negativa
<i>Cedecea davisae</i>	Prueba negativa
<i>Shewanella putrefaciens</i>	Prueba negativa
<i>Edwardsiella ictaluri</i>	Prueba negativa
<i>Psuedomonas aeruginosa</i>	Prueba negativa

Fuente: NÚÑEZ, S., 2015

Todas las cepas analizadas no son productoras de metalobetalactamasa porque se observan halos bien definidos alrededor de los discos de Imipenem y Meropenem.

CONCLUSIONES

1. La microbiota nativa del Balneario “El Salado”, está constituida por especies de *Bacillus spp*, *Staphylococcus spp*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter gergoviae*, *Budivicia aquatica*, *Cedecea davisae*, *Shewanella putrefaciens* y *Edwardsiella ictaluri*.
2. Se aislaron 26 cepas bacterias aerobias mesófilas de las cuales 17 (65,4%) fueron identificadas, correspondiendo a morfologías bacterianas de bacilos Gram negativos 8 (47%), cocos Gram positivos 5 (29%) y bacilos Gram positivos 4 (24%). En el Balneario “El Salado” predominan las bacterias Gram negativas.
3. Se determinó que la temperatura registrada para el ojo de agua del Balneario “El Salado”, ubicado en Baños de Agua Santa, en promedio tuvo un valor de 48.7°C, por lo contrario la temperatura registrada en la piscina del balneario del mismo origen tuvo un promedio de 40.2°C, y la respectiva temperatura ambiental fue de 19-20 °C. En cuanto al pH de las dos muestras recolectadas, revelan que las aguas termomineromedicinales del Balneario “El Salado” son neutras, porque los datos relejan valores promedio de pH 6,9-7.
4. En el ojo de agua del Balneario “El Salado” se cuantificó bacterias heterótrofas mesófilas, con valores menores de 5 ufc/mL, no se identificó mohos ni levaduras en ninguna muestra analizada. Del mismo modo en la piscina de este balneario se cuantificó bacterias heterótrofas mesófilas, reportando valores promedios de 8.2×10^1 ufc/mL, Por otro lado se identificaron mohos y levaduras con valores promedio de $2,15 \times 10^1$ y $1,765 \times 10^2$ respectivamente.
5. La microbiota bacterina del Balneario “El Salado” está constituida en un 53% de bacterias Gram positivas y un 47% bacterias Gram negativas, de los géneros *Bacillus*, *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Budvicia*, *Cedecea*, *Shewanella* y *Edwrdsiella*, por lo tanto el género encontrado con mayor frecuencia fue *Bacillus*.
6. Desde el punto de interés sanitario, el ojo de agua del Balneario “El Salado”, no presenta bacterias indicadoras de contaminación fecal (*Escherichia coli*), ni microorganismos patógenos (*Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*), por lo que

esta agua cumplen con 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. Por otro lado en la piscina del Balneario “El Salado” se obtuvieron indicadores fecales de la especie *Escherichia coli*, se reportaron también bacterias patógenas de la especie *Staphylococcus aureus*, y *Pseudomonas aeruginosa*.

7. Se reportó que las especies del género *Staphylococcus* y algunas especies de *Bacillus spp* aisladas en el Balneario “El Salado” son sensibles a los antimicrobianos: Ampicilina, Azitromicina, Clindamicina, Ciprofloxacina , Estreptomina, Gentamicina, Kanamicina, Oxaciclina, Penicilina G, Vancomicina, Cefalotina, Novobiocina, Eritromicina.
8. Se observó que las especies *Staphylococcus spp*, *Pseudomonas* y una especie del genero *Bacillus* fueron resistentes al antibiótico Ampicilina y Amoxicilina + ácido Clavulánico.

RECOMENDACIONES

1. Realizar en lo posible el cambio del sistema de tuberías ya que estas se observan con enmendaduras, o un buen mantenimiento para evitar la formación de biofilm (población de células que crecen unidas a una superficie) que son posibles contaminantes externos y causar graves daños a la salud de los bañistas. Por otro lado se debería cambiar el revestimiento por materiales impermeables resistentes a agresiones químicas, de superficie lisa, antideslizante y de fácil limpieza.
2. Al personal que labora en el Balneario “El Salado” se recomienda realizarse controles médicos periódicos para preservar la salud de los mismos y diagnosticar enfermedades asintomáticas. Por otro lado el uso de un equipo de protección es una exigencia que la deben adoptar para disminuir o eliminar contaminaciones cruzadas.
3. Realizar análisis microbiológicos periódicos y exhaustivos para controlar poblaciones bacterianas, debido a que el vehículo de agentes patógenos causales de brotes de infecciones bacterianas.
4. Realizar el análisis microbiológico del agua que es usada para la limpieza de las instalaciones, por lo que estas no pueden poseer características sanitarias permisibles.
5. La prueba de coliformes totales debe ser excluida, ya que puede detectar bacterias que no tienen ninguna relación con la contaminación fecal, por lo que el único indicador fecal fiable es la determinación de *Escherichia coli*.
6. Implementar un pediluvio, que permita la desinfección de los pies descalzos que pudieran estar contaminados con microorganismos, los mismos que deben ubicarse antes de entrar a las piscinas.

ANEXOS

ANEXO I: Análisis Físico-Químico del Agua del Balneario “El Salado”



RESULTADO DEL ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO DEL AGUA

pH	7,03
Sólidos Totales(mg/l)	7410
Sólidos disueltos (mg/l)	7294
Sólidos suspendidos (mg/l)	116
Oxígeno disuelto (mg/l)	6,8
Níquel (mg/l)	1,06
Plomo (mg/l)	14
Zinc (mg/l)	0,03
Nitratos (mg/l)	5,28
Nitritos (mg/l)	0,063
Sulfatos (mg/l)	3100
Hierro Total (mg/l)	0,08

Fotografía 46: Información del Análisis Físico-Químico del agua termal.
Fuente: NÚÑEZ, S. 2015

ANEXO J: Toma de Muestra para examen microbiológico



Fotografía 47: Muestra del Ojo de Agua
Fuente: NÚÑEZ, S. 2015



Fotografía 48: Muestra del piscina termal
Fuente: NÚÑEZ, S. 2015

ANEXO K: Determinación de parámetros con Multiparámetro de HANNA



Fotografía 49: Determinación de parámetros físicos y químicos en el ojo de agua.
Fuente: NÚÑEZ, S. 2015



Fotografía 50: Determinación de parámetros físicos y químicos en la piscina
Fuente: NÚÑEZ, S. 2015

ANEXO L: Preparación de medio de cultivo Mueller-Hinton y esterilización de materiales



Fotografía 51: Limpieza de Cámara de Flujo
Fuente: NÚÑEZ, S. 2015

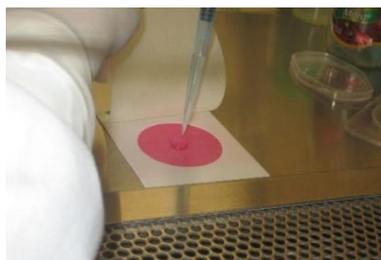


Fotografía 52: Mueller-Hinton Agar
Fuente: NÚÑEZ, S. 2015

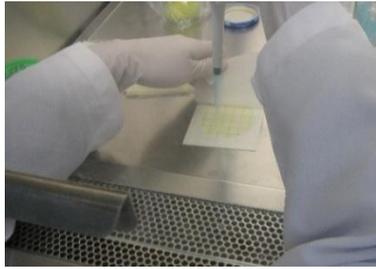


Fotografía 53: Esterilización de Puntas azules, puntas amarillas, palillos.
Fuente: NÚÑEZ, S. 2015

ANEXO M: Siembra en Placa Petrifilm de muestra de Ojo de Agua y Piscina



Fotografía 54: Siembra en Petrifilm para conteo de E.coli/Coliformes
Fuente: NÚÑEZ, S. 2015



Fotografía 55: Siembra en Petrifilm para conteo de Staph Express
Fuente: NÚÑEZ, S. 2015



Fotografía 56: Siembra en Petrifilm para conteo de Aerobios Totales
Fuente: NÚÑEZ, S. 2015

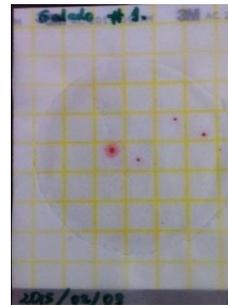


Fotografía 57: Siembra en Petrifilm para conteo de Mohos y Levaduras
Fuente: NÚÑEZ, S. 2015.



Fotografía 58: Placas Petrifilm sembradas y lista para ser incubadas a 37 °C
Fuente: NÚÑEZ, S. 2015

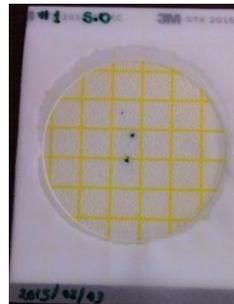
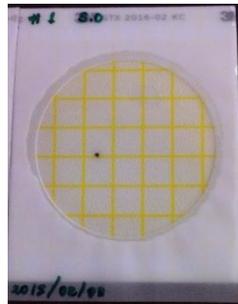
ANEXO N: Resultado del Recuento de Bacterias del Ojo de Agua después de 48 horas de incubación a 37 °C



Fotografía 59: Placas de recuento de Aerobios Totales, Muestra 1 y Muestra 2
Fuente: NÚÑEZ, S. 2015



Fotografía 60: Placas de recuento de E.coli/Coliformes, Muestra 1 y Muestra 2
Fuente: NÚÑEZ, S. 2015

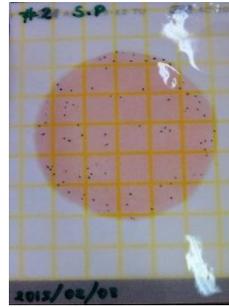
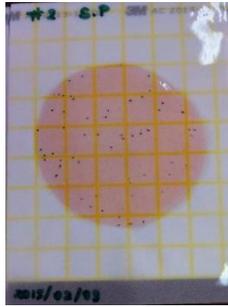


Fotografía 61: Placas de recuento de Staph Express, Muestra 1 y Muestra 2
Fuente: NÚÑEZ, S. 2015

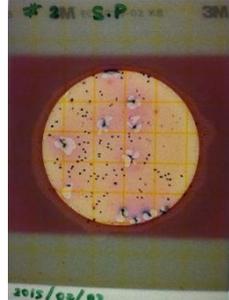
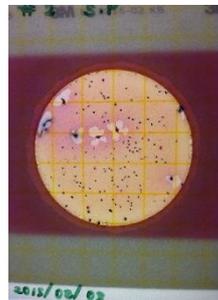


Fotografía 62: Placas de recuento de Mohos y Levaduras, Muestra 1 y Muestra 2
Fuente: NÚÑEZ, S. 2015

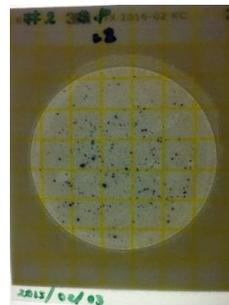
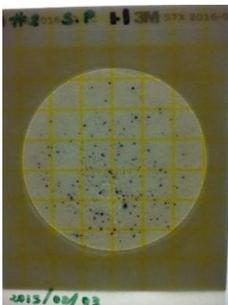
ANEXO O: Resultado del Recuento de Bacterias de la Piscina después de 48 horas de incubación a 37°C



Fotografía 63: Placas de recuento de Aerobios Totales, Muestra 1 y Muestra 2
Fuente: NÚÑEZ, S. 2015



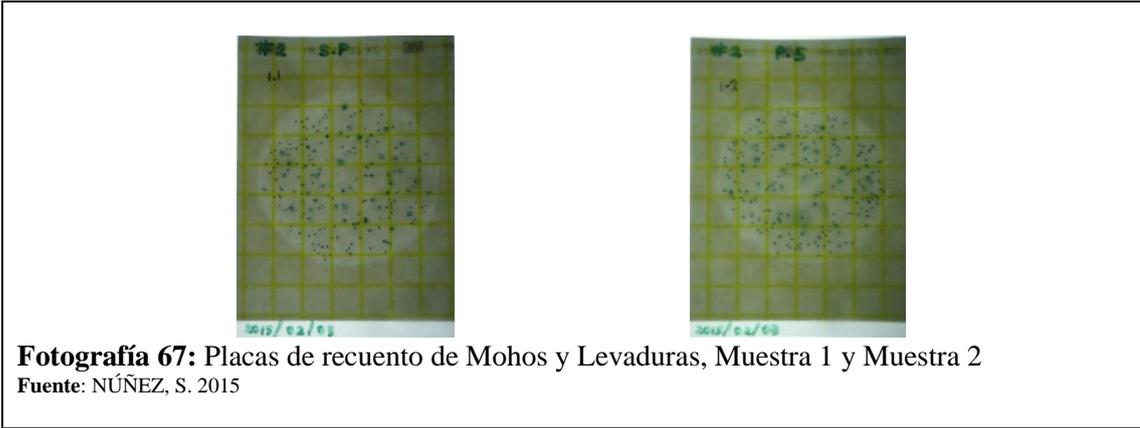
Fotografía 64: Placas de recuento de E.coli/Coliformes, Muestra 1 y Muestra 2
Fuente: NÚÑEZ, S. 2015



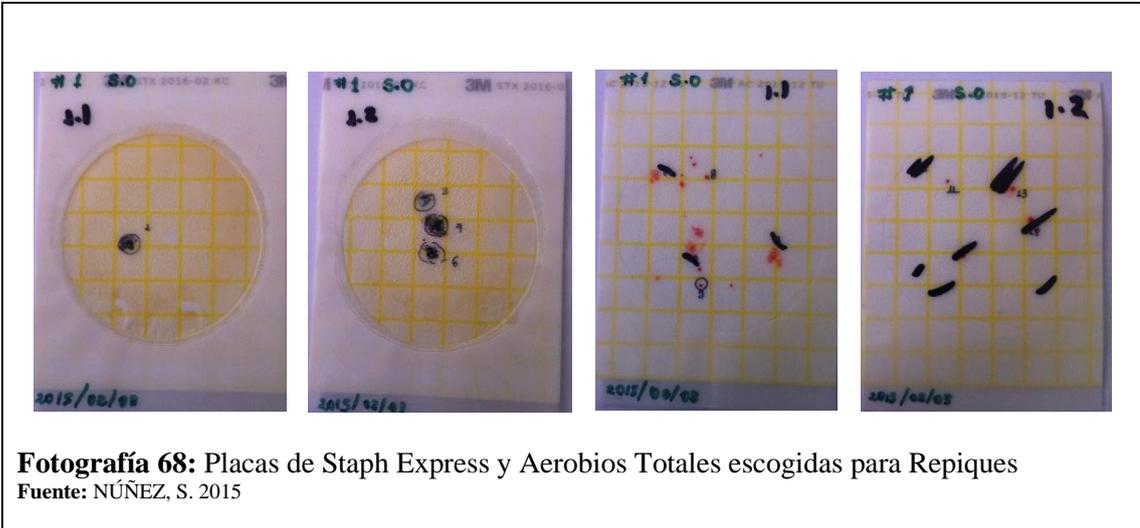
Fotografía 65: Placas de recuento de Staph Express, Muestra 1 y Muestra 2
Fuente: NÚÑEZ, S. 2015



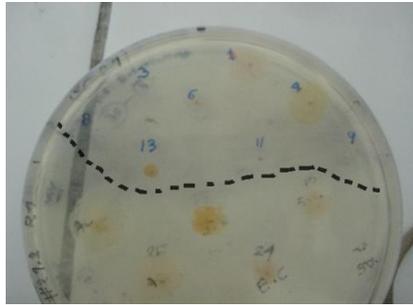
Fotografía 66: Placas de Staph Expres con Disco para STX en Muestra 2
Fuente: NÚÑEZ, S. 2015



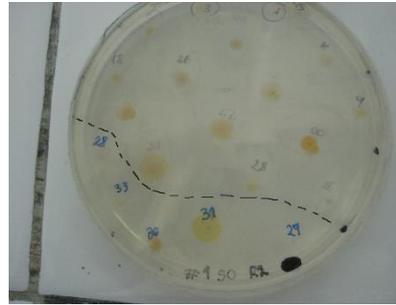
ANEXO P: Colonias escogidas para Repiques del Ojo de Agua y de la Piscina



ANEXO I: Resultado de Repiques del Ojo de Agua



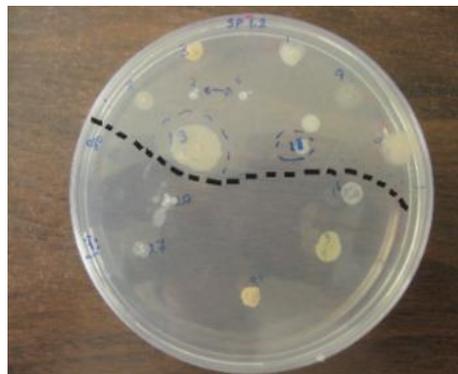
Fotografía 70: REPIQUE 1
Fuente: NÚÑEZ, S. 2015



Fotografía 71: REPIQUE 2
Fuente: NÚÑEZ, S. 2015



Fotografía 72: REPIQUE 3
Fuente: NÚÑEZ, S. 2015



Fotografía 73: REPIQUE 4
Fuente: NÚÑEZ, S. 2015

ANEXO J: Resultado de Repiques de la Piscina Muestra 1



Fotografía 74: REPIQUE 1
Fuente: NÚÑEZ, S. 2015



Fotografía 75: REPIQUE 2
Fuente: NÚÑEZ, S. 2015

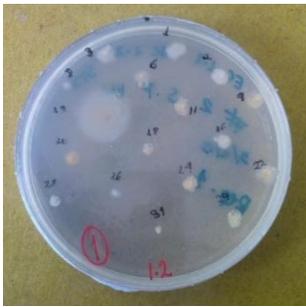


Fotografía 76: REPIQUE 3-Colonias
Fuente: NÚÑEZ, S. 2015

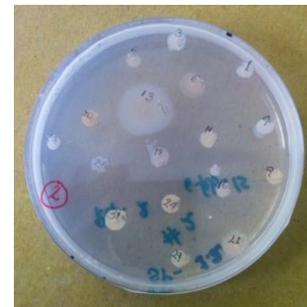


Fotografía 77: REPIQUE 4
Fuente: NÚÑEZ, S. 2015

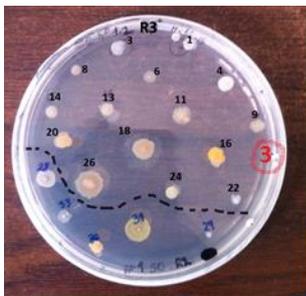
ANEXO K: Resultado de Repiques de la Piscina Muestra 2



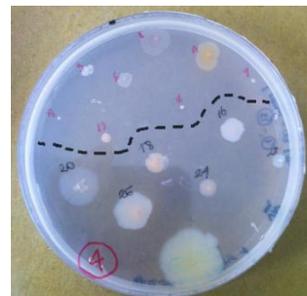
Fotografía 78: REPIQUE 1
Fuente: NÚÑEZ, S. 2015



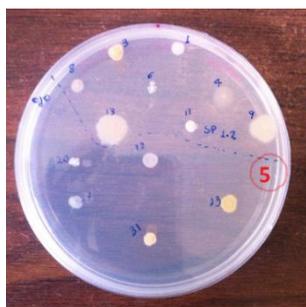
Fotografía 79: REPIQUE 2
Fuente: NÚÑEZ, S. 2015



Fotografía 80: REPIQUE 3
Fuente: NÚÑEZ, S. 2015



Fotografía 81: REPIQUE 4
Fuente: NÚÑEZ, S. 2015

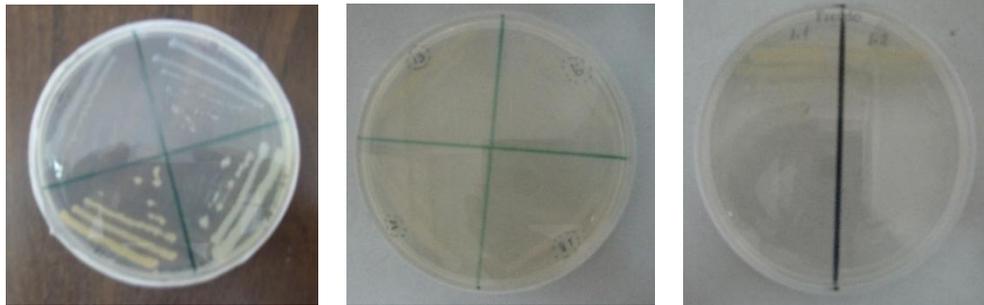


Fotografía 82: REPIQUE 5
Fuente: NÚÑEZ, S. 2015

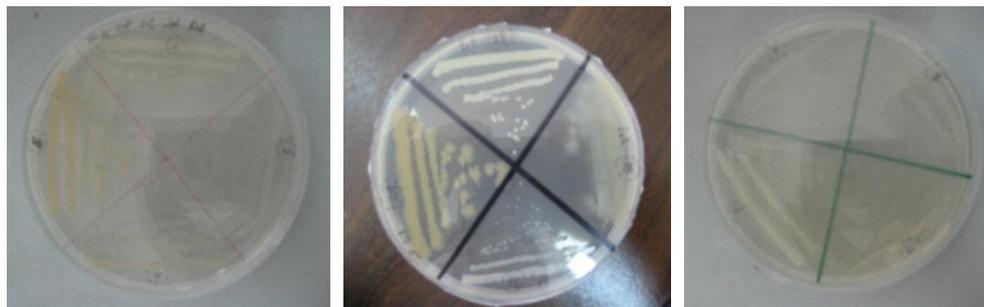
ANEXO L: Estrías de colonias del Ojo de Agua y Piscina



Fotografía 83: Estrías de colonias de Ojo de Agua
Fuente: NÚÑEZ, S. 2015



Fotografía 84: Estrías de colonias de la Piscina Muestra 1 (1-13)
Fuente: NÚÑEZ, S. 2015



Fotografía 85: Estrías de colonias de la Piscina Muestra 1 (15-29)
Fuente: NÚÑEZ, S. 2015

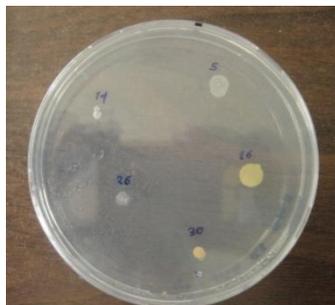


Fotografía 86: Estrías de colonias de la Piscina Muestra 2 (16-26)
Fuente: NÚÑEZ, S. 2015

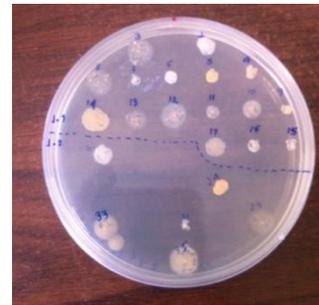


Fotografía 87: Estrías de colonias de Muestra 2 (*Pseudomonas*)
Fuente: NÚÑEZ, S. 2015

ANEXO M: Clones Puros



Fotografía 88: Clones Puros de Ojo de Agua
Fuente: NÚÑEZ, S. 2015

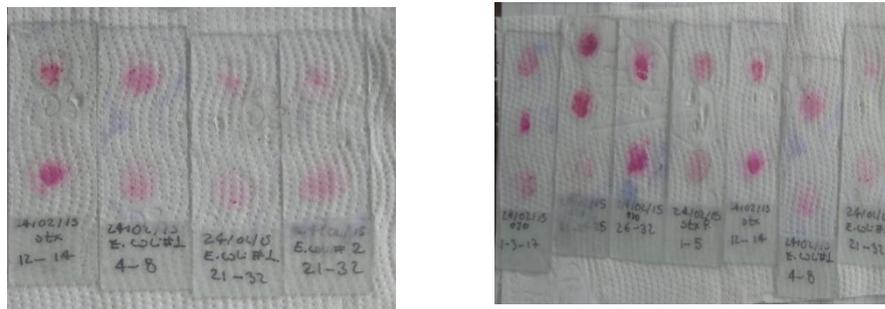


Fotografía 89: Clones Puros de la Piscina, M1 y M 2
Fuente: NÚÑEZ, S. 2015

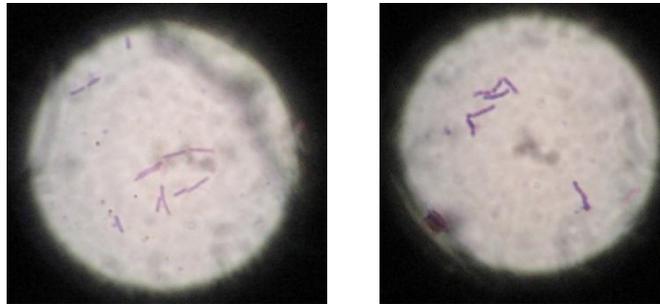


Fotografía 90: Clones puros de *Pseudomonas*.
Fuente: NÚÑEZ, S. 2015

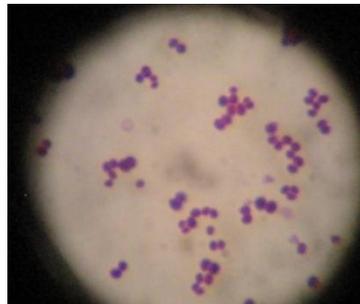
ANEXO N: Tinción Gram de Clones Puros del Ojo de Agua y de Piscina



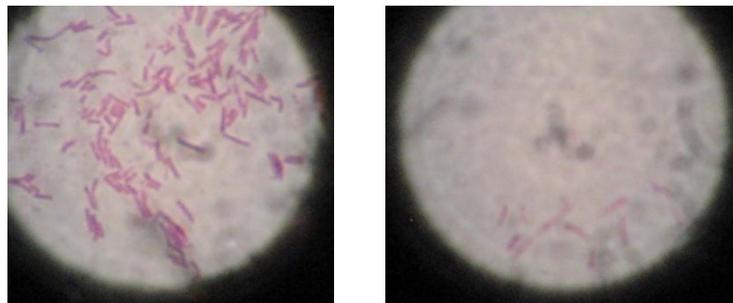
Fotografía 46: Placas para Tinción Gram del Ojo de Agua y de la Piscina
Fuente: NÚÑEZ, S. 2015



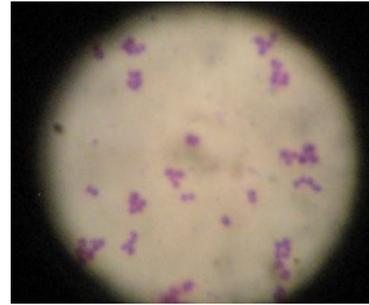
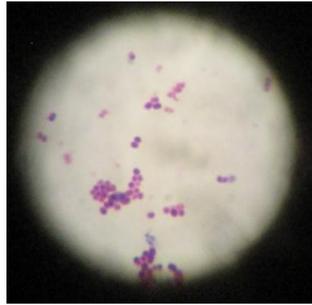
Fotografía 47: Bacilos Gram positivos del Ojo de Agua
Fuente: NÚÑEZ, S. 2015



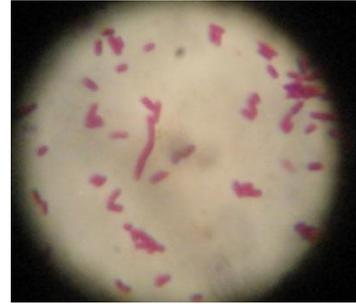
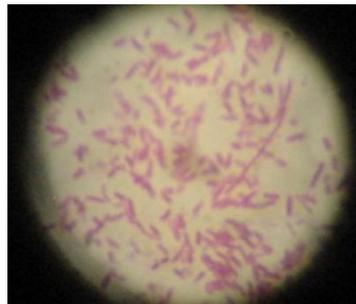
Fotografía 48: Cocos Gram positivos del Ojo de Agua
Fuente: NÚÑEZ, S. 2015



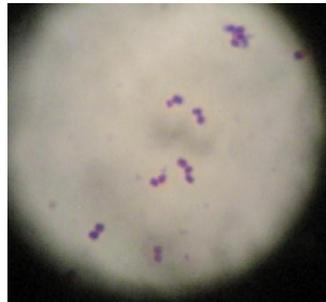
Fotografía 49: Bacilos Gram negativos de la Piscina, Muestra 1
Fuente: NÚÑEZ, S. 2015



Fotografía 910: Cocos Gram positivos de la Piscina, Muestra 1
Fuente: NÚÑEZ, S. 2015



Fotografía 51: Bacilos Gram negativos de la Piscina, Muestra 2
Fuente: NÚÑEZ, S. 2015



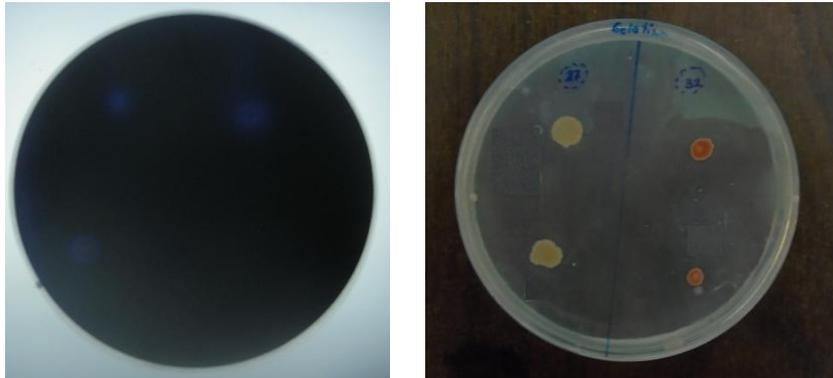
Fotografía 922: Cocos Gram positivos de la Piscina, Muestra 2
Fuente: NÚÑEZ, S. 2015

ANEXO O: Prueba de Catalasa y Oxidasa a Clones Puros.



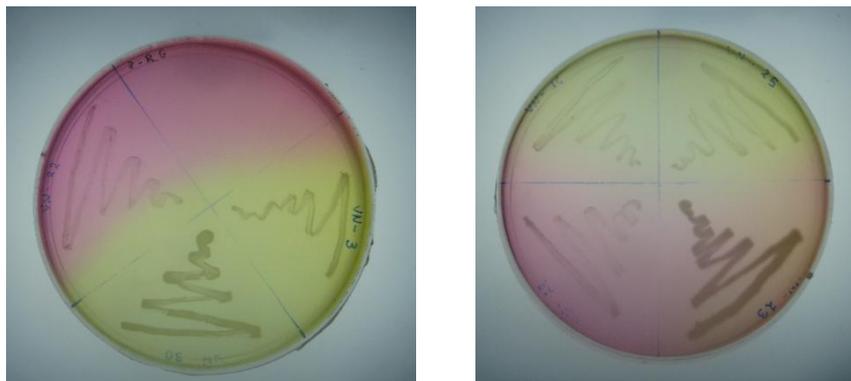
Fotografía 53: Prueba de Catalasa y Oxidasa
Fuente: NÚÑEZ, S. 2015

ANEXO P: Investigación de Bacilos Gram Positivos



Fotografía 54: Prueba positiva para Almidón y Gelatina (formación de halo)
Fuente: NÚÑEZ, S. 2015

ANEXO Q: Investigación de Cocos Gram Positivos



Fotografía 55: Fermentación de *Staphylococcus aureus* en Agar Manitol Salado
Fuente: NÚÑEZ, S. 2015

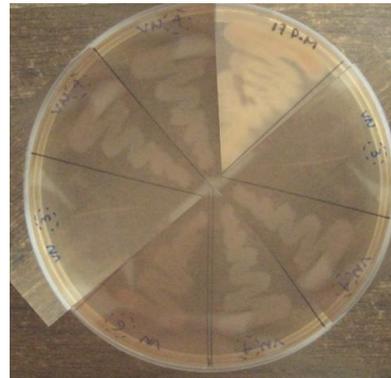


Fotografía 56: Crecimiento de *Staphylococcus spp* en Agar Manitol Salado
Fuente: NÚÑEZ, S. 2015

ANEXO R: Investigación de Bacilos Gram Negativos



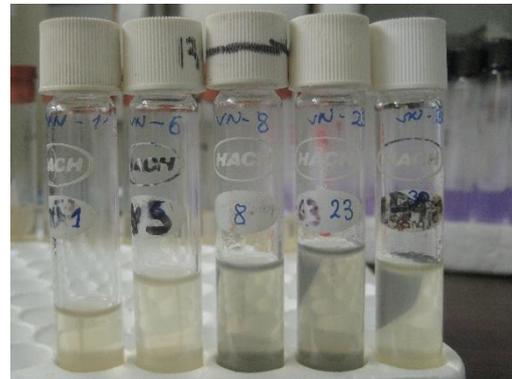
Fotografía 57: Crecimiento de colonias en Agar Eosina Azul de Metileno
Fuente: NÚÑEZ, S. 2015



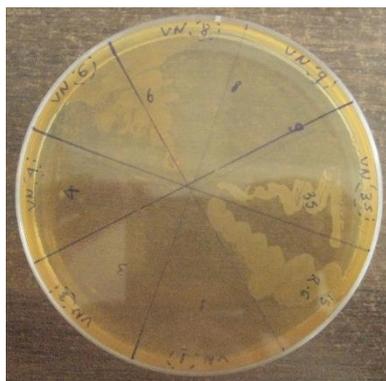
Fotografía 58: Crecimiento de colonias en Agar MacConkey.
Fuente: NÚÑEZ, S. 2015



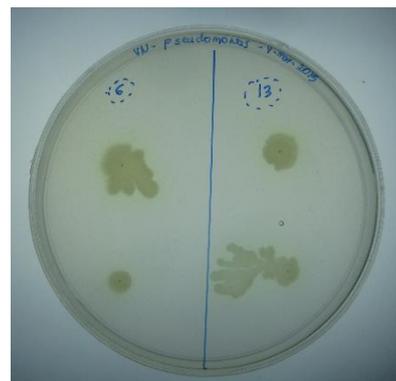
Fotografía 59: Resultados en Agar OF
Fuente: NÚÑEZ, S. 2015



Fotografía 60: Resultados de Agar Movilidad
Fuente: NÚÑEZ, S. 2015



Fotografía 61: Crecimiento de colonias en Agar Salmonella-Shigella
Fuente: NÚÑEZ, S. 2015



Fotografía 62: Crecimiento de *Pseudomonas aeruginosas* en Agar F (medio King B)
Fuente: NÚÑEZ, S. 2015

ANEXO S: Pruebas Bioquímicas de Bacilos Gram Negativos



Fotografía 63: *Citrobacter freundii*
Fuente: NÚÑEZ, S. 2015



Fotografía 64: *Enterobacter gergoviae*
Fuente: NÚÑEZ, S. 2015



Fotografía 65: *Budvicia aquatica*
Fuente: NÚÑEZ, S. 2015



Fotografía 66: *Cedecea davisae*
Fuente: NÚÑEZ, S. 2015



Fotografía 67: *Shewanella putrefaciens*
Fuente: NÚÑEZ, S. 2015



Fotografía 68: *Edwardsiella ictaluri*
Fuente: NÚÑEZ, S. 2015

ANEXO T: Antibiogramas de algunas cepas aisladas



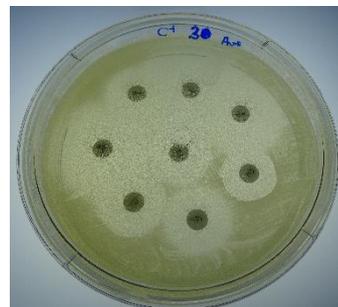
Fotografía 69: *Pseudomonas aeruginosa*
Fuente: NÚÑEZ, S. 2015



Fotografía 70: *Enterobacter gergoviae*
Fuente: NÚÑEZ, S. 2015



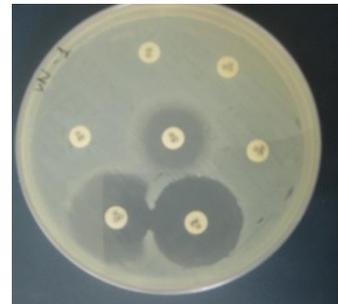
Fotografía 71: *Staphylococcus spp*
Fuente: NÚÑEZ, S. 2015



Fotografía 72: *Staphylococcus aureus*
Fuente: NÚÑEZ, S. 2015



Fotografía 73: *Bacillus spp*
Fuente: NÚÑEZ, S. 2015



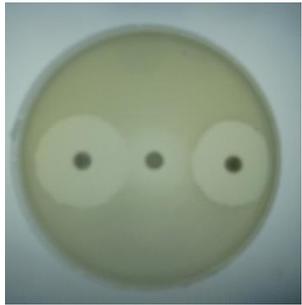
Fotografía 74: *Citrobacter freundii*
Fuente: NÚÑEZ, S. 2015



Fotografía 75: Fenotipos de resistencia de *Pseudomonas aeruginosa*
Fuente: NÚÑEZ, S. 2015



Fotografía 76: Fenotipos de resistencia de *Citrobacter freundii*
Fuente: NÚÑEZ, S. 2015



Fotografía 77: Fenotipos de resistencia de *Budvicia aquatica*
Fuente: NÚÑEZ, S. 2015



Fotografía 78: Fenotipos de resistencia de *Shewanella putrefaciens*
Fuente: NÚÑEZ, S. 2015