



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

**“ESTUDIO MICROBIOLÓGICO DE LAS AGUAS TERMALES  
DE GUAPANTE UBICADO EN LA PARROQUIA DE SAN  
ANDRÉS PERTENECIENTE AL CANTÓN SANTIAGO DE  
PÍLLARO- TUNGURAHUA”**

**Trabajo de titulación presentado para optar el grado académico de  
BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO**

**AUTOR: VIVIANA MERCEDES CRUZ CALERO**

**TUTOR: DRA. SANDRA ESCOBAR**

**RIOBAMBA – ECUADOR**

**2015**

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

El Tribunal de Tesis certifica que: El trabajo de investigación: **“ESTUDIO MICROBIOLÓGICO DE LAS AGUAS TERMALES DE GUAPANTE UBICADO EN LA PARROQUIA DE SAN ANDRÉS PERTENECIENTE AL CANTÓN SANTIAGO DE PÍLLARO- TUNGURAHUA”**, de responsabilidad de la señorita egresada Viviana Mercedes Cruz Calero, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

Dra. Sandra Escobar

**DIRECTOR DE TESIS**

\_\_\_\_\_

Dr. Gerardo Medina, M.Sc.

**MIEMBRO DE TRIBUNAL**

\_\_\_\_\_

**NOTA DE TESIS ESCRITA** \_\_\_\_\_

**DOCUMENTALISTA SISBIB – ESPOCH** \_\_\_\_\_

Yo, **Viviana Mercedes Cruz Calero**, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis; y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado, pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO.

---

VIVIANA MERCEDES CRUZ CALERO

## **DEDICATORIA**

*A Dios por darme la sabiduría para alcanzar mis metas y poder salir adelante en mis estudios. A mi esposo César que me ayudo dándome las fuerzas, comprensión, paciencia, cariño y amor incondicional, a más de sus conocimientos. A mi hijo Gael que es mi orgullo y el motor por quien quiero y seguiré luchando para cumplir todas las metas que me proponga para poder darle todo lo necesario. A mis padres Fredy y Mercedes que siempre estuvieron ahí sin dejarme desfallecer dándome ánimos para culminar con esta etapa de mi vida, en especial a mi madre que fue un pilar fundamental. A mi hermana Ivonne por ser una tía y amiga incondicional con la que sé que puedo contar siempre. A mi abuelito Ángel Cruz a quien siempre le llevo presente.*

*Viviana Mercedes Cruz Calero*

## **AGRADECIMIENTO**

*A Dios por darme la vida, ya que gracias a aquello conocí a varias personas que perdurarán en mi corazón por siempre, por guiarme en cada paso que daba ayudándome en los momentos difíciles de mi vida y por permitir que culminará con mi carrera.*

*A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por ser la institución en la cual adquirí mis conocimientos.*

*A la Dra. Sandra Escobar, al Dr. Gerardo Medina y al Dr. Felix Andueza quienes han orientado en todo momento la realización de este trabajo de investigación.*

*A toda mi familia por ser el soporte incondicional en los retos que se han presentado.*

*A mi familia putativa y amigos que formaron parte de mi vida, apoyándome y aconsejándome.*

*Muchas gracias a todos.*

*Viviana*

## CONTENIDO

CONTENIDO.....	i
ÍNDICE DE CUADROS.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	viii
RESUMEN.....	ix
SUMARY.....	x
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I.....	3
1. MARCO TEÓRICO.....	3
1.1. Agua.....	3
1.1.1. <i>Definición</i> .....	3
1.1.2. <i>Propiedades del agua</i> .....	3
1.1.3. <i>Aguas Minerales y minero-medicinales</i> .....	4
1.1.4. <i>Aguas Termales</i> .....	5
1.1.5. <i>Origen de las aguas Termales</i> .....	5
1.1.5.1. <i>Clasificación de las aguas termales</i> .....	6
1.1.5.1.1. <i>Por su temperatura</i> .....	6
1.1.5.1.2. <i>Por su composición</i> .....	6
1.1.5.1.3. <i>Por su característica geológica-genética</i> .....	7
1.1.5.1.4. <i>Por su salinidad</i> .....	7
1.1.5.1.5. <i>Por la cantidad de residuos secos</i> .....	8
1.1.5.2. <i>Propiedades terapéuticas</i> .....	8
1.1.5.3. <i>Propiedades fisicoquímicas de las aguas minerales</i> .....	8
1.1.5.3.1. <i>pH del agua</i> .....	9
1.1.5.3.2. <i>El sistema puede ser abierto o cerrado</i> .....	10
1.1.5.3.3. <i>Efecto del in común y salino</i> .....	10
1.1.5.3.4. <i>Potencial de Oxido Reducción</i> .....	10
1.1. Microbiología.....	10
1.1.1. <i>Definición</i> .....	10
1.1.2. <i>Microbiología de las aguas</i> .....	11
1.1.3. <i>Bacterias</i> .....	11
1.1.4. <i>Morfología de las bacterias</i> .....	11
1.2. <i>Identificación bacteriana</i> .....	13
1.2.1. <i>Introducción</i> .....	13

<b>1.2.2.</b>	<b><i>Medios de cultivo</i></b> .....	13
<b>1.2.2.1.</b>	<b><i>Clasificación de los medios de cultivo</i></b> .....	13
<b>1.2.3.</b>	<b><i>Técnicas utilizadas para análisis de aguas</i></b> .....	14
1.2.3.1.	<i>Placas Petrifilm</i> .....	14
1.2.3.1.1.	<i>Placas Petrifilm para Recuento de coliformes</i> .....	14
1.2.3.1.2.	<i>Placas Petrifilm para Recuento de Staphylococcus aureus</i> .....	15
1.2.3.1.3.	<i>Placas Petrifilm para Recuento de Aerobios</i> .....	15
1.2.3.1.4.	<i>Placas Petrifilm para recuento de levaduras y mohos</i> .....	15
1.2.3.2.	<i>Galería API</i> .....	16
1.2.3.2.1.	<i>Pruebas incluidas en la galería API</i> .....	16
<b>1.3.</b>	<b><i>Aguas termales de Guapante</i></b> .....	18
<b>1.3.1.</b>	<b><i>Características del agua y uso mineromedicinal</i></b> .....	18
<b>1.3.2.</b>	<b><i>Uso como tratamiento terapéutico</i></b> .....	19
<b>CAPITULO II</b> .....		20
<b>2.</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	20
<b>2.1.</b>	<b>Lugar de realización</b> .....	20
<b>2.2.</b>	<b>Materiales, equipos y reactivos</b> .....	20
<b>2.2.1.</b>	<b><i>Material biológico</i></b> .....	20
<b>2.2.2.</b>	<b><i>Materiales de Laboratorio</i></b> .....	20
<b>2.2.3.</b>	<b><i>Equipos</i></b> .....	21
<b>2.2.4.</b>	<b><i>Reactivos</i></b> .....	21
<b>2.3.</b>	<b>Metodología</b> .....	22
<b>2.3.1.</b>	<b><i>Recolección y Transporte de Agua</i></b> .....	22
2.3.1.1.	<i>Control In situ del agua</i> .....	23
<b>2.3.2</b>	<b><i>Siembra en placas Petrifilm 3M</i></b> .....	23
2.3.2.1.	<i>Recuento de Aerobios en placa Petrifilm 3M</i> .....	23
2.3.2.2.	<i>Recuento de Coliformes Totales y Fecales en Placa Petrifilm 3M</i> .....	24
2.3.2.3.	<i>Recuento de Staph Express en placa petrifilm 3M</i> .....	25
2.3.2.4.	<i>Recuento de Mohos y Levaduras en placa petrifilm 3M</i> .....	26
<b>2.3.3.</b>	<b><i>Describir la morfología macroscópica de las colonias en Agar Miuller Hinton</i></b> .....	27
<b>2.3.4.</b>	<b><i>Estabilizar el Aislado bacteriano</i></b> .....	27
2.3.4.1.	<i>Aislamiento de Aerobios</i> .....	27
2.3.4.2.	<i>Aislamiento de Coliformes Totales</i> .....	28
2.3.4.3.	<i>Aislamiento de Staphylococcus aureus</i> .....	28
<b>2.3.5.</b>	<b><i>Purificación por siembra por Agotamiento</i></b> .....	29
<b>2.3.6.</b>	<b><i>Tinción Gram</i></b> .....	29

<b>2.3.7.</b>	<b><i>Identificación bacteriana</i></b> .....	30
2.3.7.1.	<i>Prueba de la Catalasa</i> .....	30
2.3.7.2.	<i>Prueba de la oxidasa</i> .....	30
2.3.7.3.	<i>Identificación de Cocos Gram Positivos</i> .....	30
2.3.7.3.1.	<i>Agar Manitol Salado</i> .....	30
2.3.7.4.	<i>Identificación de Bacilos Gram Positivos</i> .....	31
2.3.7.4.1.	<i>Agar Almidón</i> .....	31
2.3.7.4.2.	<i>Agar Gelatina</i> .....	32
2.3.7.5.	<i>Identificación de Bacilos Gram Negativos</i> .....	32
2.3.7.5.1.	<i>Agar E.M.B</i> .....	32
2.3.7.5.2.	<i>Agar MacConkey</i> .....	33
2.3.7.5.3.	<i>Agar Salmonella Shigella</i> .....	33
2.3.7.5.4.	<i>Agar Movilidad</i> .....	34
2.3.7.5.5.	<i>Medio de Hugh Leifson (O.F.)</i> .....	34
2.3.7.8.	<i>Pruebas Bioquímicas</i> .....	35
2.3.7.8.1.	<i>Medio Kigler</i> .....	35
2.3.7.8.2.	<i>Medio SIM</i> .....	35
2.3.7.8.3.	<i>Medio Citrato</i> .....	36
2.3.7.8.4.	<i>Medio Urea</i> .....	36
2.3.7.9.	<i>Identificación de Galería API</i> .....	37
<b>2.3.8.</b>	<b><i>Esquematización del procedimiento para la identificación de cada bacteria aislada</i></b> .....	38
<b>CAPÍTULO III</b> .....		42
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIONES</b> .....	42
<b>3.1.</b>	<b>Análisis, interpretación y discusión de datos</b> .....	42
3.1.1.	<i>Propiedades fisicoquímicas del agua termal de “Guapante”</i> .....	42
3.1.2.	<i>Determinación del número de bacterias aerobias mesófilas heterótrofas</i> .....	43
3.1.3.	<i>Determinación del número de coliformes totales y fecales</i> .....	44
3.1.4.	<i>Determinación de Staphylococcus aureus y Pseudomonas</i> .....	44
3.1.5.	<i>Determinación de número de Hongos y Levaduras</i> .....	45
3.1.6.	<i>Determinación del número de bacterias Gram Negativas y Positivas predominantes</i> .....	45
3.1.7.	<i>Identificación bacteriana</i> .....	46
<b>3.2.</b>	<b>Presentación de resultados</b> .....	48
3.2.1.	<i>Control In Situ del agua de las termas de “Guapante” con ayuda de un multiparamétrico portátil de HANNA modelo HI98129</i> .....	48
3.2.2.	<i>Recuento de Aerobios Mesófilos (RAM)</i> .....	49



3.2.3.	<i>Recuento de Coliformes Totales y Fecales</i> .....	50
3.2.4.	<i>Recuento de Staphylococcus</i> .....	51
3.2.5.	<i>Recuento de Mohos y Levaduras</i> .....	52
3.2.6.	<i>Número de Gram Positivas y Gram Negativas</i> .....	53
3.2.7.	<i>Prueba de la Oxidasa y de la Catalasa</i> .....	54
3.2.8.	<i>Pruebas que se realizó para la Identificación de Cocos Gram Positivos</i> .....	54
3.2.9.	<i>Pruebas que se realizó para la identificación de Bacilos Gram Positivos</i> .....	55
3.2.10.	<i>Pruebas que se realizó para la Identificación de Bacilos Gram Negativos</i> .....	56
3.2.11.	<i>Número de bacterias Gram Negativas que son fermentadoras, oxidativas e inertes</i> .....	57
3.2.12.	<i>Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Enterobacterias</i> .....	58
3.2.13.	<i>Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias Gram Negativas – Oxidasa Positiva</i> .....	59
3.2.14.	<i>Identificación de las bacterias aisladas</i> .....	60

**CONCLUSIONES**

**RECOMENDACIONES**

**BIBLIOGRAFÍA**

**ANEXOS**

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>CUADRO 1-1.</b>	Composición de las aguas termales por su temperatura.....	6
<b>CUADRO 2-1.</b>	Composición de las aguas termales por su composición.....	6
<b>CUADRO 3-1.</b>	Clasificación de las aguas termales por su característica geológica genética.....	7
<b>CUADRO 4-1.</b>	Clasificación de las aguas termales por su salinidad.....	7
<b>CUADRO 5-1.</b>	Clasificación de las aguas termales por la cantidad de residuo sólidos.....	8
<b>CUADRO 6-1.</b>	Propiedades terapéuticas de las aguas termales.....	8
<b>CUADRO 7-2.</b>	Resultados del control In Situ del agua de las termas de “Guapante” obtenidas con el multiparámetro HANNA modelo HI98129. Complejo de Aguas termales de Guapante. Provincia Tungurahua - Santiago de Píllaro. Febrero 2015.....	48
<b>CUADRO 8-2.</b>	Recuento de Aerobios Mesófilos presentes en las termas de “Guapante”. Laboratorio de Microbiología. Facultad de Ciencias. Riobamba. Febrero 2015.....	49
<b>CUADRO 9-2.</b>	Recuento de Coliformes totales y fecales presentes en las termas de “Guapante”. Laboratorio de Microbiología. Facultad de Ciencias. Riobamba. Febrero 2015.....	50
<b>CUADRO 10-2.</b>	Recuento de <i>Staphylococcus</i> presentes en las termas de “Guapante”. Laboratorio de Microbiología. Facultad de Ciencias. Riobamba. Febrero 2015.....	51
<b>CUADRO 11-2.</b>	Recuento de Hongos y Levaduras presentes en las termas de “Guapante”. Laboratorio de Microbiología. Facultad de Ciencias. Riobamba. Febrero 2015.....	52
<b>CUADRO 12-2.</b>	Prevalencia de Gram Positivas o Gram Negativas en el Complejo de Aguas Termales de “Guapante”. Laboratorio de Microbiología. Facultad de Ciencias. Riobamba. Febrero 2015.....	53
<b>CUADRO 13-2.</b>	Prueba de la Oxidasa y Catalasa de las cepas puras. Laboratorio de Microbiología. Facultad de Ciencias. Riobamba. Febrero 2015.....	54

<b>CUADRO 14-2.</b>	Pruebas para la Identificación de Cocos Gram Positivos aislados de las aguas termales de “Guapante”. Laboratorio de Microbiología. Facultad de Ciencias. Riobamba. Febrero 2015.....	54
<b>CUADRO 15-2.</b>	Pruebas para la Identificación de Bacilos Gram Positivos aislado de las aguas termales de “Guapante”. Laboratorio de Microbiología. Facultad de Ciencias. Riobamba. Febrero 2015.....	55
<b>CUADRO 16-2.</b>	Pruebas para la Identificación de Bacilos Gram Negativos aislados de las aguas termales de “Guapante”. Laboratorio de Microbiología. Facultad de Ciencias. Riobamba. Febrero 2015.....	56
<b>CUADRO 17-2.</b>	Número de Bacterias Gram Negativas que son Fermentadoras, Oxidativas e Inertes aislados de las aguas termales de “Guapante”. Laboratorio de Microbiología. Facultad de Ciencias. Riobamba. Febrero 2015.....	57
<b>CUADRO 18-2.</b>	Pruebas Bioquímicas para Identificación de Enterobacterias aisladas de las aguas termales de “Guapante”. Laboratorio de Microbiología. Facultad de Ciencias. Riobamba. Febrero 2015.....	58
<b>CUADRO 19-2.</b>	Pruebas Bioquímicas y Galería API utilizadas para Identificación de las bacterias Gram negativas – oxidasa positiva de las aguas termales de “Guapante”. Laboratorio de Microbiología. Facultad de Ciencias. Riobamba. Febrero 2015.....	59
<b>CUADRO 20-2.</b>	Identificación del Género y Especie de bacterias aisladas de las aguas termales de “Guapante”. Laboratorio de Microbiología. Facultad de Ciencias. Riobamba. Febrero 2015.....	60

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1-1.</b> Origen de las aguas termales.....	5
<b>FIGURA 2-1.</b> Morfología de cocos, bacilos y otros.....	12
<b>FIGURA 3-1.</b> Galería API.....	16
<b>FIGURA 4-1.</b> Complejo de Aguas Termales de Guapante.....	18
<b>FIGURA 5-1.</b> Características Físicas y Químicas.....	19

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>GRÁFICO 1-2.</b>	Media del Recuento de Aerobios Mesófilos de las aguas termales de “Guapante”.....	49
<b>GRÁFICO 2-2.</b>	Medias del Recuento de Coliformes Totales y Fecales de las termas de “Guapante”.....	50
<b>GRÁFICO 3-2.</b>	Medias de Recuento de <i>Staphylococcus</i> de las termas de “Guapante”.....	51
<b>GRÁFICO 4-2.</b>	Medias de Recuento de Mohos y Levaduras de las termas de “Guapante”.....	52
<b>GRÁFICO 5-2.</b>	Medias del número de Bacterias Gram Positivas y Negativas existen las termas de “Guapante”.....	53

## RESUMEN

En Ecuador uno de los atractivos turísticos son las aguas termales que son visitadas por la población cercana a las mismas o visitantes extranjeros que conocen de su existencia, estas aguas por su alta composición en minerales y por su temperatura, se cree que tienen efectos terapéuticos sobre la salud humana. El Objetivo de este trabajo fue determinar y comparar, mediante un método de análisis, la presencia de microorganismos autóctonos y alóctonos en las aguas termales de Guapante del Cantón Píllaro, Provincia de Tungurahua. Para ello se recolectó muestras de agua en envases estériles, para el crecimiento bacteriano se empleó el método rápido de Petrifilm, para la siembra se utilizó el método de siembra por agotamiento para purificar la colonia y obtener una cepa pura, concluyendo con la identificación bacteriana por medio de Pruebas Bioquímicas. Obteniendo como resultado un recuento de microorganismos en el ojo de agua  $>$  a 365UFC/ml, mientras que en la piscina el recuento fue de 4,5UFC/ml, es decir en el ojo comienza la contaminación remediando en la piscina con la utilización de cloro. Los microorganismos identificados son de origen autóctono como son *Bacillus subtilis*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter amalonaticus* y *Alcaligenes faecalis* y otros de origen aloctónos como son: *Escherichia coli*, *Leminorella grimontii*, *Afipia clevelandensis*, *Rahnella aquatilis* y *Staphylococcus aureus* que son consideradas bacterias patógenas causantes de enfermedades. Concluyendo que en este balneario existen bacterias potencialmente patógenas aunque en muy baja concentración, por lo que se debe implementar un sistema de tratamiento de agua para garantizar su calidad, asegurando la salud del visitante y realizar más muestreos para conocer si el sistema que se vaya a implementar funciona.

**Palabras clave:** <BACTERIA> <AGUA HIPOTERMAL> <CALIDAD MICROBIANA>  
<CALIDAD SANITARIA> <AGUAS TERMALES DE GUAPANTE>

## ABSTRACT

Tourist attractins in Ecuador are the hot springs, it is visited by close to them or foreign visitors who know of its existence population, these waters for their high mineral composition and temperatura, and it believed to have therapeutic effects human health. The objective of this study was to determine and compare, by a method of analysis, the presence of native and non-native organism in hot spring Guapante Píllaro Canton, Tungurahua province. Wáter samples were collected in sterile containers, for bacterial growth Petrifilm rapid method for seeding planting method was used to purify exhaustion colony and get a pure strain, concluding with bacterial identification was used by biochemical test. Resulting in a count of microorganisms in wáter hole > to 365UFC/cm<sub>2</sub>, while pool was 4,5UFC/cm<sub>2</sub>, that is at stope start remedying pollution in pool with the use of chlorine. The microorganisms identified are of indigenous origin such as *Bacillus subtilis*, *Enterobacter Cloacae*, *Citrobacter amalonaticus* and *Alcaligenes Faecalis* and other allochthonous origin such as *Escherichia coli*, *Leminorella grimontii*, *Afipia clevelandensis*, *Rahnella aquatilis* and *Staphylococcus aureus* which are considered pathogenic disease-causing bacteria. Concluding that although there are potentially pathogenic bacteria very low concentration in this resort, so must implement a wáter teatment system to ensure quality, ensuring health of visitors and make more samples to know if the system is going to be worked implement.

**Keywords:** <BACTERIA> <HYPHOTHERMAL> <MICROBIAL QUALITY> <HEALTH QUALITY> <HOT SPRING FROM GUAPANTE>

## INTRODUCCIÓN

Desde épocas antiguas, el hombre observó que los animales entraban en aguas calientes con un tipo de olor y sabor distinto a lo normal para curar sus alas o patas heridas. El hombre sin ninguna clase de conocimiento y solo por observación distinguió que estas aguas tenían algún efecto “sagrado” que ayudaba a la mejora de estos animales. (LIMÓN, 2009, p. 409).

La humanidad siempre ha estado en constante búsqueda de remedios que ayuden a la sanación de diversas dolencias y enfermedades, es así como han encontrado remedio en estas aguas termales. Se llamaron aguas termales a las aguas minerales que salen del suelo con una temperatura mayor de 5°C de diferencia que la superficial. (LIMÓN, 2009, p. 409).

En la actualidad se ha dado poca importancia a las aguas termales, pero la OMS a partir del año 1986 ha declarado como herramienta alternativa a la hidrología médica como parte de la ciencia que trata el agua, aceptándola como parte de la medicina. (SUIZA, 2006, p. 32).

Investigaciones hechas en España en diferentes fuentes de aguas termales demuestran que existe una gran diversidad microbiana que depende de factores físico-químicos como (pH, temperatura y composición) para poder sobrevivir y multiplicarse. Algunos de los géneros bacterianos que se han encontrado son del tipo *Pseudomona*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Enterobacter*, *Acinetobacter* y *Arthrobacter*. (DE LA ROSA, MOSSO., 2001, pp. 3-11).

En Ecuador un estudio microbiológico realizado en las aguas termales del Nono ubicado en la Provincia de Pichincha en el año 2001 por el Laboratorio de Análisis en el Ecuador *LABOLAB*, dio a conocer que estas aguas azufradas de color turbio son aptas para utilizarse como balneario, ya que se encontraron microorganismos autóctonos en cantidades normales. (CEVALLOS, 2009, pp. 29-30)

En la localidad de Guapante se encuentran las aguas termales que llevan el mismo nombre, estas aguas tienen una temperatura de 25°C, por lo que se las considera hipotermas, en estas aguas se han realizado estudios físico-químicos con lo que se ha comprobado que el tipo de agua es bicarbonada magnésica. (BURBANO, Napoleón., et.al, 2013).

En Ecuador se han realizado estudios físico-químicos de la mayoría de manantiales reflejando la cantidad de minerales, pH, temperatura, entre otros. (BURBANO, et.al, 2013, p. 39). Así también tenemos



que se han realizado algunos estudios microbiológicos en fuentes de aguas termales pero no revelan los datos microbiológicos que se obtuvieron con dicho estudio. (CEVALLOS, 2009, pp. 29-30)

Trabajos microbiológicos de interés sanitario realizados en aguas termales en diferentes países afirman la existencia de microorganismos patógenos que pueden desarrollarse en estos sitios y que son responsables de atentar contra la salud del usuario que asiste a dichos balnearios. (DE LA ROSA, MOSSO, 2001, p.153).

Apoyándonos en las normas jurídicas vigentes en la Constitución de la República del Ecuador, registro oficial del 20 de octubre del 2008, basándonos en el Art. 14. que dice "...que se reconocerá el derecho de la población a vivir en un ambiente sano y ecológicamente equilibrado, que garantice la sostenibilidad y el buen vivir, *sumak kawsay*...", recalcando, en el Art. 66. donde se indica que "se reconoce y garantizará a las personas: ...El derecho a vivir en un ambiente sano, ecológicamente equilibrado, libre de contaminación y en armonía con la naturaleza..." (BUEN VIVIR, 2013-2017)

El Plan Nacional del Buen Vivir es una parte fundamental donde se contempla la necesidad de mejorar la calidad de vida de la población, por lo que se realizará esta evaluación detallada de la microbiota del manantial termal de Guapante con el fin de garantizar la calidad de agua para que el usuario se sienta privilegiado de bañarse en unas aguas termales que asegurarán su salud, a más que se fomentara a un turismo sostenible haciéndole más competitivo e impulsando al desarrollo de la Parroquia de San Andrés dando mayor cantidad de ingresos financieros. (BUEN VIVIR. 2013-2017)

En el cantón Santiago de Píllaro existe una población de 38.357 que se ven beneficiados por este estudio microbiológico, ya que se garantizaría la calidad de aguas de esta fuente termal llamando a más turistas a la visita de este balneario. Esta fuente se encuentra cerca de dos ciudades importantes de gran concurrencia como son Ambato y Latacunga. (ECUADOR, 2010)

Por medio de este estudio podríamos encontrar bacterias que no han sido antes mencionadas, y que puedan ser de gran importancia para el sector industrial de alimentos como farmacéutico, ya que pueden contener enzimas que puedan ser útiles en estas dos áreas abriendo posibilidades para la mejora y competitividad de las industrias impulsando al desarrollo de las mismas. (ARCOS, et. al, 2014, pp. 72-74).

# CAPÍTULO I

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1. Agua

#### 1.1.1. *Definición*

El agua es un elemento primordial para la vida, no se puede decir que es un sistema homogéneo, ya que en él pueden estar disueltas varias sustancias. El agua está compuesta por una fase acuosa, fase gaseosa y una o más fases sólidas. (CLAPÉS, 2001, pp. 75-85).

El agua se genera por las precipitaciones, cae en forma de lluvia o nieve que al interactuar con el suelo puede arrastrar ciertos gases producto de la descomposición y respiración del mismo, así como minerales provenientes del material rocoso hasta encontrar un equilibrio químico físico, cualquier alteración en la o presión puede hacer que se altere este sistema provocando una variación en la composición química, haciendo que se disuelvan más minerales o a su vez la precipitación de estos por recombinación iónica. (AGUILERA, 2010, pp. 15-18)

#### 1.1.2. *Propiedades del agua*

Las características que vaya a tener el agua están relacionada a las propiedades físicas químicas y a su estructura. El agua pura está constituida estructuralmente por dos moléculas de hidrogeno y una de oxigeno unidas por puentes de hidrogeno (H-O-H) separadas por un ángulo de 105°. Estas peculiaridades le distinguen al agua de otras moléculas parecidas como son el amoniacio  $\text{NH}_3$  y el sulfuro de hidrogeno  $\text{H}_2\text{S}$  las cuales a presión y temperatura normal se encuentran en estado gaseoso mientras que el agua se encuentra en estado líquido. (LIMÓN, 2009, p.409)

El agua se encuentra formando polímeros esto se identificó mediante rayos X, estos polímeros se encuentran unidos mediante puentes de hidrogeno que son los que les confieren ciertas propiedades propias como son: (SUÁREZ, FAGUNDO, 1994, p. 2-8).

- Alto calor específico: este calor es mayor que los demás líquidos, explicando por qué el agua del océano no se calienta durante el día por acción directa del sol.

- Elevados puntos de congelación (0°C) y de ebullición (100°C): en comparación con las moléculas o elementos de igual conformación.
- Alta densidad: La máxima densidad se alcanza cuando el agua llega a una temperatura 4°C disminuyendo así su volumen y provocando su enfriamiento. Cuando se disminuye la temperatura por debajo de esta temperatura el volumen aumenta.
- Elevado momento dipolo: esto hace que las moléculas presenten cargas positivas o negativas produciendo el enlazamiento con minerales iónicos, dando la característica de disolvente universal.

De la mineralización del agua dependen algunas de las características osmóticas, densidad y viscosidad, etc., sin embargo la gran mayoría de los efectos sobre el organismo se obtiene por la cantidad de iones disueltos, entre los que figuran: (SUÁREZ, FAGUNDO, 1994, pp. 2-8).

- Cationes: sodio, calcio, magnesio, potasio, litio, hierro, etc.
- Aniones: cloruro, sulfato, bicarbonato, fluoruro, yoduro, etc.

El equilibrio químico está regido por leyes termodinámicas, en cuya composición química intervienen también otros factores: microbiológicos, geológicos, hidrogeológicos, geomorfológicos, climáticos y ambientales. (FAGUNDO, GONZÁLEZ, 2000, pp. 3-8)

Según investigaciones se ha demostrado que el agua global no varía, pero si su cantidad local y calidad, constituyéndole como un recurso renovable que interviene en un ciclo hidrológico. (FAGUNDO, GONZÁLEZ, 2000, pp. 3-8)

### **1.1.3. Aguas Minerales y minero-medicinales**

El agua puede contener disueltos ciertos minerales, distinguiéndolas de las aguas puras, porque su caudal, temperatura, composición química y bacteriológica es totalmente invariable. Cuando a estas aguas se les reconoce por tener efectos terapéuticos se les denomina minero-medicinales. (SUÁREZ, FAGUNDO, 1994, pp. 2-8).

La utilización de estas aguas por su acción, características que presenta y aplicación terapéutica se denomina como balneoterapia. Estas aguas minerales termales por su alta temperatura y elevada concentración de sales hace desfavorable para la vida de microorganismos pero sin embargo un estudio revela que cualquier hábitat acuática que sea posee cierta población microbiana propia del lugar que suele ser característica del tipo de agua y de sus propiedades físico-químicas (pH, temperatura y concentración de sales). (SUÁREZ, FAGUNDO, 1994, pp. 2-8).

#### 1.1.4. Aguas Termales

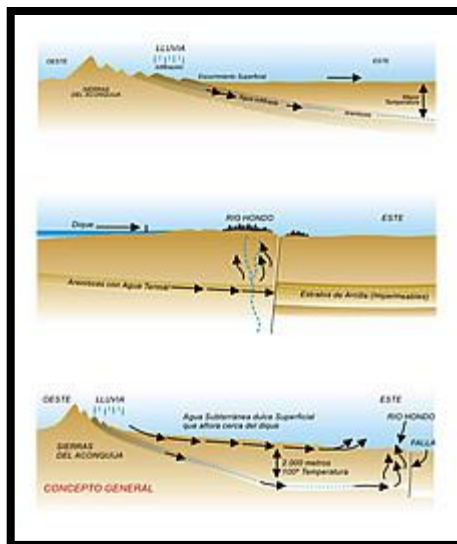
Son aguas que surgen de la tierra con una temperatura mayor de 5°C que la temperatura de la superficie, esto se debe a que estas aguas a cierta profundidad se encuentran a mayor temperatura y salen al exterior en forma de vapor que al llegar a la superficie se condensan y forman los manantiales de agua caliente. Estas aguas por provenir del subsuelo arrastran consigo una serie de minerales por lo que a estas aguas se les considera que tienen efectos medicinales. (LIMÓN, 2009, p. 409)

Las características físico-químicas de estas aguas vienen dadas por la de los terrenos de donde provienen. Por ello, su contenido en sales, su temperatura y las características hidrológicas son muy variables. No obstante, su temperatura en el punto de surgencia supera los 35-40°C. (SUÁREZ, FAGUNDO, 1994, pp. 2-8).

#### 1.1.5. Origen de las aguas Termales

El origen de las aguas termales viene dado por el subsuelo en donde se filtran hasta llegar a capas profundas donde la temperatura es alta, por medio de fisuras o fracturas vuelve a la superficie en forma de vapor que se condensa formando los manantiales termales. Por esta razón que este se le denomina de origen geotérmico. (Ver FIGURA 1.1.) (AGUILERA, 2010, pp. 15-18)

FIGURA 1-1. Origen de las aguas termales



Fuente: (ORTÍZ, 2003)

Realizado por: Viviana M. Cruz C.

### 1.1.5.1. Clasificación de las aguas termales

Hay diferentes formas de clasificar a las aguas termales, pero tomaremos cinco formas de clasificación: (ARMIJO, 1968, pp. 302-345).

#### 1.1.5.1.1. Por su temperatura: (Ver CUADRO 1.1.)

**CUADRO 1-1.** Composición de las aguas termales por su temperatura.

TIPO DE AGUA	TEMPERATURA
AGUAS FRÍAS	Menos de 20°C
HIPOTERMALES	20°C a 35°C
MESOTERMALES	35°C a 45°C
HIPERTERMALES	45°C a 100 °C

**Fuente:** (LIMÓN, 2009, p. 409).

**Realizado por:** Viviana M. Cruz C.

#### 1.1.5.1.2. Por su composición: (Ver CUADRO 2.1.)

**CUADRO 2-1.** Composición de las aguas termales por su composición.

TIPO DE AGUA	COMPOSICIÓN
SULFURADAS	Contiene sulfuros
CLORURADAS	Contiene cloro
SULFATADAS	Contiene Sulfatos
CÁLCICAS	Contiene Calcio
FERRUGINOSAS	Contiene Hierro
RADIATIVAS	Contiene sustancias radiactivas.
OLIGOMÉTALICAS	Contiene sustancias oligométalicas

**Fuente:** (LIMÓN, 2009, p. 409).

**Realizado por:** Viviana M. Cruz C.

**1.1.5.1.3. Por su característica geológica-genética (Ver CUADRO 3.1.)**

**CUADRO 3-1.** Clasificación de las aguas termales por su característica geológica genética

<b>TIPO DE AGUA</b>	<b>ORIGEN Y FORMACIÓN</b>
<b>METEÓRICA</b>	Aguas que recién formaron parte del ciclo hidrológico
<b>CONGÉNITA</b>	Aguas que permanecieron periodos largos fuera del contacto con la atmosfera
<b>METAMÓRFICA</b>	Aguas que estuvieron en contacto con rocas durante su formación
<b>MAGMÁTICA</b>	Aguas que estuvieron en contacto con el magma a corta distancia
<b>PLUTÓNICA</b>	Aguas que estuvieron en contacto con el magma a larga distancia
<b>JUVENIL</b>	Aguas que no se han puesto en contacto con la atmosfera

**Fuente:** (BURBANO, 2013, p. 39)

**Realizado por:** Viviana M. Cruz C.

**1.1.5.1.4. Por su salinidad (Ver CUADRO 4.1.)**

**CUADRO 4-1.** Clasificación de las aguas termales por su salinidad.

<b>STD (mg/l)</b>	<b>CLASIFICACIÓN</b>	<b>PORCENTAJE</b>
<b>0 A 160</b>	Salinidad baja	5
<b>160 A 480</b>	Salinidad intermedia	23
<b>480 A 1440</b>	Salinidad alta	29
<b>MAYOR A 1440</b>	Salinidad muy alta	43

**Fuente:** (BURBANO, 2013, p. 39)

**Realizado por:** Viviana M. Cruz C.

**1.1.5.1.5. Por la cantidad de residuos secos (Ver CUADRO 5.1.)**

**CUADRO 5-1.** Clasificación de las aguas termales por la cantidad de residuos sólidos.

<b>STD (gr/l)</b>	<b>CLASIFICACIÓN</b>
<b>1 A 1.5</b>	Minerales
<b>0.2 A 1.0</b>	Medio minerales
<b>MENOS DE 0.2</b>	Oligo minerales

**Fuente:** (BURBANO, 2013, p. 39)

**Realizado por:** Viviana M. Cruz C.

**1.1.5.2. Propiedades terapéuticas**

El tipo de agua depende de que el punto de surgencia este a una temperatura baja o alta, van a poseer propiedades terapéuticas, así tenemos que a: Temperatura baja ayudan vasoconstricción y a temperatura alta poseen poder vasodilatador, analgésico y relajante. (Ver **CUADRO 6.1.**) (ARMIJO, 1968, pp. 302-345)

**CUADRO 6-1.** Propiedades terapéuticas de las aguas termales.

<b>TIPO DE AGUA</b>	<b>ACCIÓN TERAPÉUTICA</b>
<b>SULFURADAS</b>	Antialérgica, desintoxicantes, antiflogísticas, antirreumáticas.
<b>CLORURADAS</b>	Anticatarrales, antiinflamatorias
<b>SULFATADAS</b>	Colagogas, purgante
<b>CÁLCICAS</b>	Antialérgicas, sedantes, antiinflamatorias
<b>FERRUGINOSAS</b>	Antianémicas y reconstituyentes
<b>RADIATIVAS</b>	Equilibradoras, sedantes
<b>OLIGOMÉTALICAS</b>	Diuréticas

**Fuente:** (LIMÓN, 2009, p. 409).

**Realizado por:** Viviana M. Cruz C.

**1.1.5.3. Propiedades fisicoquímicas de las aguas minerales.**

Factores climatológicos, hidrogeológicos, geológicos, geomorfológicos, pedológicos, antrópicos y químicos son los causantes de dar la composición química a las aguas naturales, esto se da por

medio de precipitaciones por percolación, ya sea de rocas de diferente composición: (GARCÍA, Ángela., 2006, pp.)

- Rocas salinas originan aguas cloruradas alcalinas
- Calizas y dolomías originan aguas bicarbonadas cálcicas o cálcicas magnésicas.
- Anhidrita o depósitos de yeso originan aguas sulfatadas cálcicas.
- Piritas originan aguas sulfatadas.
- Granitos originan aguas alcalinas o alcalinas terreas.
- Rocas básicas originan aguas bicarbonatadas magnésicas.

El estudio de las rocas del sitio donde se encuentra el acuífero podrán dar a conocer las características del agua, es decir si las rocas son ultra básicas el tipo de agua será bicarbonatadas magnésicas, acompañada de la hidrogeología determinará la concentración de metales disueltos en el agua, así como su dureza. (LLORET, LABUS, 2013, pp. 1-9)

El agua circula por rocas ricas en  $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{CaSO}_4$  y  $\text{NaCl}$  formando los diferentes tipos de agua, aunque el tipo de vegetación, relieve, tipo de terreno y el grado de erosión también fija la composición química. La actividad microbiana, el pH y la producción de gas dependerán de las condiciones climáticas ya que la lluvia arrastra consigo cantidad de microorganismos al interior de estos acuíferos. Factores pedológicos que estudia la descripción, génesis y clasificación del suelo que determinara la composición bacteriana y química del agua. (LLORET, LABUS, 2013, pp. 1-9)

Las leyes termodinámicas como la solubilidad de minerales, concentración de gases, pH, Potencial Redox, fuerza iónica e ion común determinan la composición química, esta composición solo manifiesta las propiedades del acuífero y de la fuente que lo alimenta. (FAGUNDO, 1998, p. 19).

#### **1.1.5.3.1.      *pH del agua***

El agua por lo general debería tener un pH neutro, es decir un pH 7 pero por la concentración de minerales disueltos y por estar en contacto con la atmosfera es capaz de disolver  $\text{CO}_2$ , por lo que el pH viene a variar y oscila entre 6 a 9. (FAGUNDO, 1998, p. 19).

El rango de pH en los manantiales de regiones no cársicas va desde 5 hasta 6,5: mientras que en regiones cársicas el pH va desde 7 a 8. El pH del agua varía de 4,5, a 7 al interaccionar prolongadamente con las rocas carbonatadas y al ser filtradas por el suelo, donde existe gran cantidad de  $\text{CO}_2$ , el agua se carga con altas concentraciones de  $\text{HCO}_3$  e iones  $\text{CO}_3$ , lo que lo alcaliniza a un pH cercano a 8.4. (FAGUNDO, 1998, p. 19).



#### ***1.1.5.3.2. El sistema puede ser abierto o cerrado.***

Mediante dos sistemas se da la disolución de los carbonatos en la naturaleza. Cuando la disolución de CO<sub>2</sub>, se da en base solo al suministro inicial y no se repone, tenemos un sistema cerrado. Cuando la concentración de CO<sub>2</sub> es constante, el proceso de disolución de minerales carbonatados por parte de las aguas minerales, consideramos un sistema abierto. (FAGUNDO, 1998, p. 19).

#### ***1.1.5.3.3. Efecto del ion común y salino.***

La capacidad para diluir los minerales en el agua, se ve disminuida cuando arrastra iones comunes bajando el coeficiente de actividad, mientras que cuando existe una alta concentración arrastra iones no comunes incrementando su fuerza iónica. A este fenómeno se conoce como “Efecto Salino o de Fuerza Iónica”. (FAGUNDO, 1998, p. 19).

#### ***1.1.5.3.4. Potencial de Oxido Reducción.***

El análogo del pH es el potencial Redox (pE), que es la fuerza de una reacción de óxido reducción que mide la tendencia oxidante o reductora de una solución. (FAGUNDO, 1998, p. 19).

Los minerales de valencia variable, pueden ceder o ganar electrones. En el sistema de aguas subterráneas, se da la transferencia entre constituyentes disueltos, gases o sólidos mediante un sinnúmero de reacciones químicas, este proceso cambia los estados de oxidación o reducción tanto de los reaccionantes como de los productos. (FAGUNDO, 1998, p. 19).

### **1.1. Microbiología**

#### ***1.1.1. Definición***

Es la ciencia que estudia los microorganismos y sus actividades benéficas o perjudiciales, con el fin de adquirir una comprensión de estos microorganismos para aumentar sus beneficios o reducir sus daños. (ARCOS, et. al., 2001, pp. 72-74).

### **1.1.2. Microbiología de las aguas**

La microbiología de aguas se ocupa de las relaciones que existe entre los microorganismos y el medio acuático en el que se desarrollan, así como la interacción que pueden presentar con otros microorganismos. (DE LA ROSA, MOSSO, 2001, p. 153).

Estas características microbiológicas vienen regidas por la población microbiana y que de una manera afectan a la calidad del agua. La microbiología del agua identifica microorganismos bacterianos, hongos y protozoos, que se encuentran formando parte de este medio acuático. (DE LA ROSA, MOSSO, 2001, p. 153).

Algunos de los géneros bacterianos que se han encontrado son del tipo *Pseudomona*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Enterobacter*, *Acinetobacter* y *Arthrobacter*. (DE LA ROSA, MOSSO, 2001, p. 153).

### **1.1.3. Bacterias**

Las bacterias son microorganismos unicelulares de un tamaño imperceptible para el ojo humano solo se las puede observar bajo microscopio, su tamaño varía y tienen diversas formas en: hélice, esferas o barras. Las bacterias pertenecen al reino de las procariotas, es decir, que no tienen un núcleo celular diferenciado ni orgánulos, solo tienen una membrana celular compuesta por peptidoglicanos y lipopolisacáridos, y flagelos que les permita desplazarse ya que la mayoría de bacterias son móviles. (CRUZ, María., HERMOSILLA, Germán., 1992)

### **1.1.4. Morfología de las bacterias**

Las bacterias son microorganismos unicelulares que se dividen por fisión binaria o bipartición. El tamaño varía de acuerdo a la especie el rango va desde 0,2um de diámetro hasta 40 um por ej. *Escherichia coli* 0.5 a 2um. (Célula procariota típica). (CRUZ, HERMOSILLA, 1992, pp. 15-22)

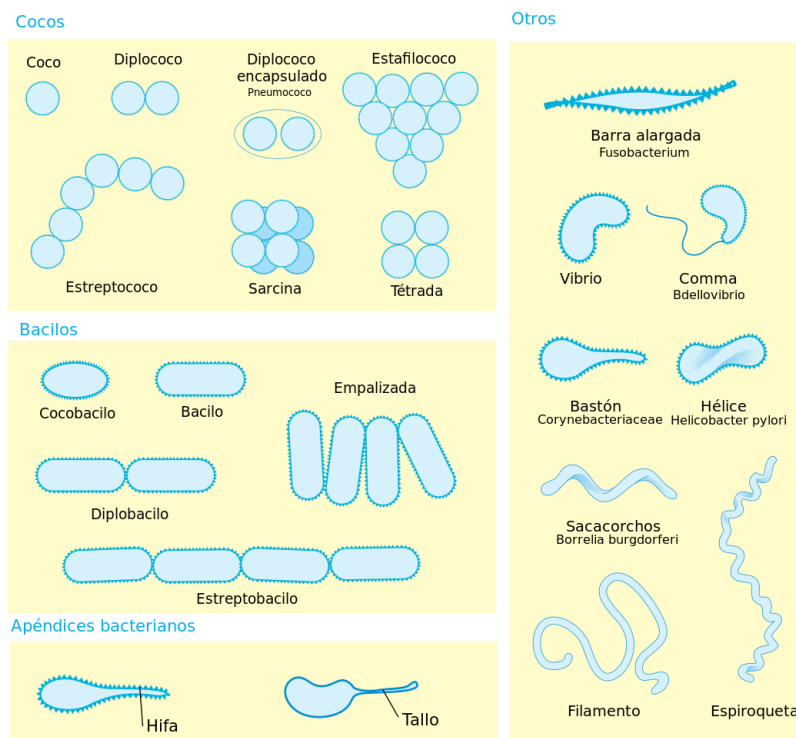
La morfología de una célula bacteriana determina la rigidez de la pared celular. Las bacterias adoptan diferentes formas esféricas, bastones o espiral. Cocos se denomina a las bacterianas en forma esférica que pueden ser redondos, ovoides o elípticos; a las que tienen forma de bastón alargado se denominan bacilos que pueden ser cilíndricos, fusiformes, etc; y las que tienen forma de bastón curvado o en espiral se les denomina espirilos. Existe bacterias que tienen forma de coma, a estos se les denomina vibrios. Aunque pueden adoptar otras formas con filamentos,

ramificaciones, anillos o prolongaciones a estas bacterias que adoptan otra forma se les denomina pleomorficas. (CRUZ, HERMOSILLA, 1992, pp. 15-22)

Las células bacterianas al ser observadas al microscopio pueden verse como células aisladas o en agrupaciones. Así tenemos, agrupaciones de dos formas cocoideas llamadas diplococo. La división celular en uno o más planos es la característica para poder diferenciar a la especie bacteriana. Cuando la división celular tiene lugar en dos planos se forman las tétradas y si la bipartición es en tres o más planos ortogonales originan la agrupación de 8 o más células, pueden también observarse en cadena que son divisiones en un solo plano característica de los *Streptococcus* o en racimos irregulares que es una fisión binaria en planos no perpendiculares que son característica de los *Staphylococcus*. (Ver FIGURA 2.1.) Los bacilos pueden adoptar varias disposiciones en forma de V, V inversa, Y o de letras griegas. (CRUZ, HERMOSILLA, 1992, pp. 15-22)

Algunas células bacterianas están provistas por un flagelo que le da a la célula la capacidad de desplazarse o moverse, este flagelo es de naturaleza proteica que puede ser polar localizado a cada extremo de la bacteria o peritrica es decir localizada alrededor de la superficie celular. (CRUZ, HERMOSILLA, 1992, pp. 15-22)

**FIGURA 2-1.** Morfología de cocos, bacilos y otros.



**Fuente:** <http://docentes.educacion.navarra.es/metayosa/bach2/2biomicro4.html>

La tinción diferencial de Gram es una técnica de coloración con valor taxonómico, permite diferenciar a las bacterias Gram positivas de las Bacterias Gram negativas, se puede dividir en estos dos grandes grupos gracias a la composición de su pared celular que al reaccionar con los diferentes reactivos nos permite observar al microscopio estas características. (CRUZ, HERMOSILLA, 1992, pp. 15-22)

## **1.2. Identificación bacteriana**

### **1.2.1. Introducción**

En el agua podemos encontrar una gran variedad de microorganismos que se encuentran formando poblaciones mixtas es decir diferentes tipos de especie. Sin embargo la microbiología a través de diferentes pruebas ha logrado obtener especies aisladas (cepas puras), que necesitan de medios de cultivo específicos para su crecimiento. (CLAPÉS, 2001, pp. 75-85)

Los microorganismos necesitan todos los nutrientes necesarios y condiciones ambientales adecuadas para su desarrollo. Los medios de cultivo en los que se va a desarrollar cierta bacteria deben tener estos nutrientes y estar en condiciones estériles para su posterior utilización. (ESPAÑA., 1992, pp. 1654-1697)

### **1.2.2. Medios de cultivo**

Son mezclas de nutrientes que en condiciones adecuadas de concentración permite el crecimiento de microorganismos. (COMPANY, 2000, pp. 30-35)

El uso de los medios sirve para dos propósitos principales:

- Favorecer el crecimiento de un microorganismo en particular.
- Facilitar las reacciones bioquímicas para la identificación de los microorganismos.

#### **1.2.2.1. Clasificación de los medios de cultivo**

De acuerdo a la naturaleza: (COMPANY, 2000, pp. 30-35)

- Naturales: son medios de cultivo que se obtienen a través de sustancias de origen animal o vegetal, que son complementadas por la adición de minerales u otras sustancias.
- Sintéticos: son medios que tienen en su composición definida en forma cuali o cuantitativa.

De acuerdo al uso: (COMPANY, 2000, pp. 30-35)

- Medios de Diferenciales: contienen indicadores de productos derivados de la actividad microbiana, permite identificar la fisiología del microorganismo.
- Medios Selectivos: son medios solidos diseñados para el aislamiento de un microorganismo específico.
- Medios de Enriquecimiento: son medios líquidos que permiten aumentar número de microorganismos, es decir favorecen su crecimiento.

De acuerdo a su estado físico: (COMPANY, 2000, pp. 30-35)

- Pueden ser líquidos, semisólidos y sólidos.

### ***1.2.3. Técnicas utilizadas para análisis de aguas***

Dentro de las técnicas más utilizadas tenemos: Filtración por membrana, Vertido en placa, Numero más Probable (NMP) y siembra en placas petrifilm. (Petrifilm 3M, 2003)

#### ***1.2.3.1. Placas Petrifilm***

Una de las técnicas más utilizadas hoy en día es la siembra en placas petrifilm, tanto en laboratorios de alimentos, clínicos y de farmacia, ya que es una técnica fácil, rápida y precisa. (Petrifilm 3M, 2003)

Estas placas de petrifilm son medios de cultivo ya preparados en formatos, constituida de adhesivos, películas (film) y nutrientes. Es un análisis microbiológico que se da en solo tres pasos: Inoculación, Incubación y Lectura. (Petrifilm 3M, 2003)

##### ***1.2.3.1.1. Placas Petrifilm para Recuento de coliformes***

Para el crecimiento de coliformes las placas Petrifilm para coliformes contienen nutrientes del Violeta Rojo Bilis modificado (VRB), un agente gelificante soluble en agua fría y un indicador de tetrazolio que facilita el conteo de las colonias por la coloración roja con producción de gas que es producida por la fermentación metabólica de la lactosa y que será atrapado en el film superior. (Petrifilm 3M, 2003)

Según el método de la **ISO** se define a las coliformes por la capacidad de desarrollarse en medios de cultivos específicos y selectivos. (Petrifilm 3M, 2003)

- En el método **ISO 4832** se utiliza el recuento de colonias para enumerar a los coliformes, mientras que en las **ISO 4831** se utiliza en método del Número Más Probable (NMP). (Petrifilm 3M, 2003)
- Los coliformes son bacilos Gram negativos con la capacidad de producir gas por la fermentación metabólica de la lactosa según la definición de la **AOAC INTERNATIONAL** y la **FDA/BAM**. (Petrifilm 3M, 2003)
- Las placas petrifilm para coliformes, el tiempo y temperatura dependerá del método que se utilice. (Petrifilm 3M, 2003)

#### **1.2.3.1.2. Placas Petrifilm para Recuento de *Staphylococcus aureus*.**

Las placas de petrifilm para recuento de *Staphylococcus* contiene un medio de cultivo cromogénico Baird Parker que es muy selectivo y diferencial para *Staphylococcus aureus* dando como resultado unas colonias de color rojo-violeta, en ocasiones pueden aparecer colonias que no presenten color rojo-violeta, por lo que se necesita de un disco que contiene azul-O toluidina que facilita la visualización de las colonias por la formación de un halo después de haber pasado el tiempo de incubación. (Petrifilm 3M, 2003)

#### **1.2.3.1.3. Placas Petrifilm para Recuento de Aerobios**

Para el crecimiento y desarrollo de bacterias aerobias se utiliza las placas de petrifilm que contienen un caldo nutritivo MRS, después de la incubación se observará colonias de color rojo a café-rojizo que pueden tener producción de gas o no. (Petrifilm 3M, 2003)

#### **1.2.3.1.4. Placas Petrifilm para recuento de levaduras y mohos**

Las placas de Petrifilm para recuento de mohos y levaduras contienen un colorante Rosa de Bengala que facilita el recuento de mohos y levaduras. (Petrifilm 3M, 2003)

- Las levaduras son colonias pequeñas de color rosa-tostado a azul-verdoso, al tacto sobre el film superior se sentirá alzadas en forma convexa.
- Los hongos son colonias amplias de forma plana irregular.

### 1.2.3.2. Galería API

La batería de Galería API es un sistema de identificación rápida para bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* y otras bacterias Gram negativas, consta de 24 test bioquímicos estandarizados, miniaturizados y una base de datos. Permiten obtener resultados de forma rápida, eficaz y además se puede realizar varias pruebas a la vez. Este sistema está formado por 24 pocillos o microtubos que contienen distintos sustratos deshidratados, cada uno es una prueba bioquímica distinta. (Ver **FIGURA 3.1.**) (DOMÍNGUEZ, 2006)

En los microtubos se inocula una suspensión de microorganismos, en agua o solución salina para rehidratar a los mismos. La galería se incuba a 35°C y por efecto del metabolismo del microorganismo se produce un cambio de color espontaneo. Para observar el cambio de color a veces necesita de reactivos. (DOMÍNGUEZ, 2006)

**FIGURA 3-1.** Galería API



**Realizado por:** Viviana M. Cruz C.

Para la obtención de los resultados se necesita de tabla de lectura donde se indica los microorganismos según el color que hayan presentado en cada pocillo y se compara.

#### 1.2.3.2.1. Pruebas incluidas en la galería API

- En el pocillo 1 se da la reacción de la Lisina (LYS), donde la lisina descarboxilasa – al azul bromotimol pasa de verde a azul, indicando la producción de amina cadaverina. La reacción es positiva cuando presenta color verde o azul y negativa cuando el color es amarillo. (DOMÍNGUEZ, 2006)
- En el pocillo 2 se da la reacción de la Ornitina (ORN), donde la ornitina descarboxilasa – al azul bromotimol se mantiene azul indicando la producción de la amina putrescina.

La reacción es positiva si el color es azul y negativo si el color es amarillo o verde. (DOMÍNGUEZ, 2006)

- En el pocillo 3 se da la producción de H<sub>2</sub>S, donde el tiosulfato se reduce a H<sub>2</sub>S que reacciona con sales de hierro produciendo un precipitado negro. La reacción es positiva si el color es marrón o negro y negativo si el color es color paja. (DOMÍNGUEZ, 2006)
- En los pocillo 4, 5 y 6 se da una fermentación de la Glucosa (GLU), Manitol (MAN) y de la Xilosa (XYL); el azul bromotimol cambia de azul a amarillo como resultado de la producción de ácido a partir de la fermentación de carbohidratos. La reacción es positiva si el color es amarillo y negativo si el color es azul o verde. (DOMÍNGUEZ, 2006)
- En el pocillo 7 se da una hidrólisis de la ONPG por la B-galactosidasa da lugar a la producción de ácido a partir de la fermentación de carbohidratos. La reacción es positiva si el color es amarillo y negativo si es incoloro. (DOMÍNGUEZ, 2006)
- En el pocillo 8 se produce indol (IND) a partir de triptófano y da lugar a un complejo rosa/rojo cuando se añade el reactivo de Kovac's. La reacción es positiva si el color rosa o rojo y negativo si es incolora. (DOMÍNGUEZ, 2006)
- En el pocillo 9 se produce la hidrólisis de la ureasa (UR) dando lugar a la formación de amoníaco que provoca un incremento de pH que hace virar el rojo fenol de amarillo a rosa o rojo. La reacción es positiva si el color es rosa muy profundo y negativo si el color es color paja a rosa salmón pálido. (DOMÍNGUEZ, 2006)
- En el pocillo 10 se da la producción de acetoína (VP) a partir de glucosa se detecta por la formación de un complejo rosa o rojo después de la adicción de alfa naftol y creatina en presencia de KOH. La reacción es positiva si el color es rosa muy profundo o rojo y negativo si es incoloro o color rosa pálido. (DOMÍNGUEZ, 2006)
- En el pocillo 11 se da la utilización de citrato (CIT) como única fuente de carbono, esto da lugar al incremento de pH que proporciona un cambio de color del azul de bromotimol de verde a azul. La reacción es positiva si el color es azul y negativo si el color es amarillo o verde pálido. (DOMÍNGUEZ, 2006)
- En el pocillo 12 se da la producción del ácido indolpirúvico a partir del triptófano por la triptófano desaminasa (TDA) cuando se añaden los iones de hierro. Los microorganismos indol positivo pueden dar coloración marrón en caso de resultado negativo. La reacción es positiva si el color es rojo cereza y negativo si el color es color paja. (DOMÍNGUEZ, 2006)
- En el pocillo 13 las enzimas proteolíticas licuan la gelatina (GEL) dando lugar a la formación de partículas negras que quedarán dispersadas por el pocillo. La reacción es positiva si el color es negro y negativo si es incoloro. (DOMÍNGUEZ, 2006)
- En el pocillo 14 cuando el malonato sódico (MAL) es la única fuente de carbono se inhibe la conversión del ácido succínico a ácido fumárico. Un microorganismo no crece. Una reacción sódica a la vez que el sulfato de amonio se utiliza como fuente de nitrógeno



dando lugar a hidróxido sódico que aumenta la alcalinidad dando color azul. La reacción es positiva si el color es azul y negativo si el color es verde. (DOMÍNGUEZ, 2006)

- En los pocillos 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 y 24 se produce una fermentación del inositol (INO), sorbitol (SOR), ramnosa (RHA), sucrosa (SUC), lactosa (LAC), arabinosa (ARA), adonitol (ADO), rafinosa (RAF), salicina (SAL) y arginina (ARG); respectivamente. El azul bromotimol cambia de azul a amarillo como resultado de la producción de ácido por la fermentación de carbohidratos. La reacción es positiva si el color es amarillo y negativo si el color es azul. (DOMÍNGUEZ, 2006)

### 1.3. Aguas termales de Guapante

El Ecuador dispone de fuentes de aguas termales gracias a sus características geológicas del territorio. Las aguas termales de Guapante se encuentran situada cerca del volcán Cotopaxi en la Parroquia de San Andrés perteneciente al cantón Santiago de Píllaro ubicado en la Provincia de Tungurahua. (Ver **FIGURA 4.1.**) (BURBANO, 2013, p. 39)

**FIGURA 4-1.** Complejo de Aguas Termales de Guapante.



**Realizado por:** Viviana M. Cruz C.

Son aguas bicarbonatadas magnésicas, inodoras, incoloras y de sabor ligeramente salino, por tener minerales disueltos se la utiliza para tratamientos terapéuticos por lo que existe gran afluencia de personas para tratar sus dolencias en estas aguas. (BURBANO, 2013, p. 39)

#### 1.3.1. Características del agua y uso mineromedicinal

- **Características Químicas:** son agua bicarbonatadas magnésicas. Con una pH de 7.7, conductividad de 1000  $\mu\text{s}/\text{cm}$  y una dureza de 317 mg/l.

- **Características Físicas:** Hipotermales con una temperatura de 25°C. Inodoro e incolora.  
(Ver FIGURA 5.1.)

FIGURA 5-1. Características Físicas y Químicas.



**Fuente:** (BURBANO, 2013, p. 39)

**Realizado por:** Viviana M. Cruz C.

### 1.3.2. *Uso como tratamiento terapéutico*

Las aguas ejercen su acción por dos vías:

- **Vía Tópica:** Por inmersión del cuerpo y contacto del agua con la piel.
- **Vía Oral:** Toma del agua para ayudar en diversos procesos metabólicos y patológicos.

(DE LA ROSA, et.al, 2001, p. 153)

## CAPITULO II

### 2. PARTE EXPERIMENTAL

#### 2.1. Lugar de realización

La presente investigación se desarrolló en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH.

#### 2.2. Materiales, equipos y reactivos

##### 2.2.1. *Material biológico*

Muestra de agua termal del balneario de Guapante, se tomó dos muestras de la piscina y dos del punto de emergencia.

##### 2.2.2. *Materiales de Laboratorio*

- Frascos estériles de 200ml.
- Placas Petrifilm para identificación de bacterias aerobias, estafilococos coliformes Fecales y Totales, y para mohos y levaduras.
- Asa de inculación.
- Placas Petri.
- Pipetas Pasteur
- Pipetas Graduadas de 1ml.
- Puntas azules.
- Puntas amarillas.
- Porta objetos.
- Erlenmeyer de 250 ml, 1000 ml.
- Espátula
- Gradilla
- Tubos de ensayo
- Jeringuilla 5 ml, 10 ml.
- Papel aluminio

- Papel filtro
- Pera de succión
- Pizeta
- Pinza de soporte universal
- Pinza de tubo de ensayo
- Pipetas graduadas de 1 ml, 5 ml, 10 ml.
- Probetas de 100ml, 250ml, 500ml
- Varilla de agitación
- Vasos de precipitación de 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml.

### **2.2.3. Equipos**

- Balanza analítica (Sartorius)
- Balanza de precisión
- Cámara de Reflujo
- Estufa (Ecocell)
- Microscopio
- PHmetro
- Refrigeradora
- Reverbero eléctrico
- Filtro de Membrana

### **2.2.4. Reactivos**

- Solución de Yodo Yodurado
- Cloruro mercúrico
- Ácido clorhídrico concentrado
- Agar
- Peptona
- Almidón soluble
- Gelatina
- Glicerol
- Fosfato potásico
- Sulfato magnésico
- Cloruro sódico
- Fosfato dipotásico
- Triptona

- Vaselina estéril
- Peróxido de hidrogeno (Agua oxigenada)
- Reactivo de Kovacs
- Tirillas de oxidasa
- Agar Miuller Hinton
- Agar Almidón
- Agar Gelatina
- Agar MacConkey
- Agar *Salmonella- Shigella*
- Agar Manitol Salado
- Agar E.M.B.
- Medio Hugh Leifson
- Agar Movilidad
- Agar Simmons
- Agar Kligler
- Agar Urea
- Agar SIM
- Galería API
- Tricloruro de Hierro
- Hidróxido de Potasio
- Tetrafenilendiamina

### **2.3. Metodología**

#### **2.3.1. *Recolección y Transporte de Agua***

- Retirar la tapa del frasco estéril, sostener el recipiente teniendo cuidado de no tocar la boca del recipiente ni el interior del mismo. (AGUINAGA, 1996, pp. 144-174)
- Sumergir en la vertiente termal en dirección contraria a corriente procurando que la cantidad de agua sea representativa más o menos 200ml, dejando un espacio de aire para facilitar la agitación de la muestra. Realizar el muestreo por duplicado. (ECUADOR, 2011)
- El transporte se realizará en un porta muestras (COOLER) a una temperatura de 10°C, en un tiempo no mayor a 6 horas. (ECUADOR, 2011)

### **2.3.1.1. Control In situ del agua**

El control contempla la revisión de parámetros definidos del agua para conocer la composición de sólidos totales solubles, temperatura, pH, esto se realiza con un multiparametro de Hanna previo a la recolección de la muestra. (LÓPEZ, et. al., 1997, pp. 9-22)

Luego se procede a la recolección de la muestra con debido cuidado, siguiendo las normas de recolección y transporte de aguas. (ECUADOR, 2011)

### **2.3.2 Siembra en placas Petrifilm 3M**

Las placas petrifilm 3M son placas listas para ser utilizadas contienen un agente soluble en frío, nutrientes e indicadores deshidratados, estables al almacenamiento, estas placas reemplazan a las placas Petri en las que se utilizan agaros convencionales y otros elementos utilizados en análisis de agua. (Petrifilm 3M, 2003)

#### **2.3.2.1. Recuento de Aerobios en placa Petrifilm 3M para bacterias aerobias mesófilas:**

Este Petrifilm nos permite el recuento de bacterias aerobias mesófilas heterótrofas, observándose la formación de colonias rojas en el gel. (Petrifilm 3M, 2003)

La siembra se realizó siguiendo los siguientes puntos: (Petrifilm 3M, 2003)

- La placa petrifilm 3M para Recuento de Aerobios se colocó dentro de la cámara de reflujo en una superficie plana y se levantó el film superior
- Se añadió 1 ml de agua con una pipeta perpendicular a la placa petrifilm en el centro del film inferior.
- Se bajó el film superior con cuidado para impedir que se formen burbujas.
- Con el aplicador con la cara lisa hacia arriba se presionó el film superior sobre el inóculo formando un área circular. No girar ni deslizar el aplicador.
- Se levantó el aplicador y dejamos solidificar por un minuto.

En la incubación se siguió el siguiente procedimiento: (Petrifilm 3M, 2003)

- Se Incubó en una estufa las placas petrifilm 3M para aerobios con la cara hacia arriba, se puede apilar hasta 20 placas a una temperatura de 35°C por un lapso de 24 a 48 horas, el tiempo varía según la colonia. Unas colonias necesitan más tiempo para crecer.

La interpretación se realizó de la siguiente manera: (Petrifilm 3M, 2003)

- Para el recuento de las colonias se utilizó una fuente de luz con aumento y se contó las colonias rojas independiente de su tamaño e intensidad del color, las colonias se colorearon de este color debido a un indicador rojo neutro presente en la placa. Solo se contó las colonias que se encuentran dentro del área inoculada que es un área aproximadamente de 20cm<sup>2</sup>.

### ***2.3.2.2. Recuento de Coliformes Totales y Fecales en Placa Petrifilm 3M***

Las placas de Petrifilm para recuento de coliformes totales, también nos sirvió para el recuento de coliformes fecales, observando la colonia y si hubo o no producción de gas. (Petrifilm 3M, 2003)

La siembra se realizó siguiendo los siguientes pasos: (Petrifilm 3M, 2003)

- Se colocó en la superficie plana de la cámara de reflujo el petrifilm 3M para recuento de Coliformes Totales, se alzó el film superior con una pipeta colocada en forma perpendicular colocó 1ml de muestra en el centro del film inferior.
- Se bajó el film superior con cuidado impidiendo que formen burbujas de aire.
- Con el aplicador con la cara lisa hacia abajo se presionó el film superior para repartir el inóculo sobre el área circular, no deslizar ni girar el aplicador.
- Se elevó el aplicador y se esperó un minuto hasta que se solidifique el gel.

En la incubación se siguió el siguiente procedimiento: (Petrifilm 3M, 2003)

- Se incubó en una estufa la placa con la cara hacia arriba, se apiló 20 placas. La temperatura de incubación fue de 35°C, se dejó en incubación por un tiempo de 24 a 48 horas.

La interpretación se hizo: (Petrifilm 3M, 2003)

- Para el recuento de coliformes Totales, se utilizó una fuente de luz con aumento y contamos las colonias rojas con o sin producción de gas que se encuentran dentro del área circular, el color de las colonias se debe a un indicador modificado el Violeta Rojo Bilis (VRB). Coliformes Fecales son las colonias productoras de gas.

### **2.3.2.3. Recuento de Staph Express en placa petrifilm 3M**

Las placas petrifilm sirvieron para el recuento de *Staphylococcus aureus*, las colonias se observaron con la utilización de discos. (Petrifilm 3M, 2003)

La siembra se realizó de la siguiente manera: (Petrifilm 3M, 2003)

- Dentro de una cámara de reflujo, se colocó la placa petrifilm 3M para recuento de *Staphylococcus aureus* que contiene agar Baird-Parker modificado sobre una superficie nivelada, se levantó el film superior y con una pipeta dispuesta en forma perpendicular se colocó 1ml de la muestra en el centro del film inferior.
- Se bajó el film superior con debida precaución para impedir que se formen burbujas de aire.
- Con el aplicador con cara lisa hacia abajo se presionó sobre el film superior distribuyendo el inóculo por toda la superficie circular. No deslizar ni girar el aplicador. Se esperó por un minuto hasta que el gel se solidifique.

Para la incubación se realizó el siguiente procedimiento: (Petrifilm 3M, 2003)

- Se colocó en la estufa la placa con la cara hacia arriba se apiló hasta 20 placas. La temperatura de incubación fue de 35°C por un lapso de 24 horas.

La interpretación se realizó de la siguiente manera: (Petrifilm 3M, 2003)

- Pasado las 24 horas se realizó la lectura de las placas utilizando una lupa con una fuente de luz con aumento, si aparecieron únicamente colonias rojo-violeta se las cuenta como *Staphylococcus aureus* y concluye el ensayo.
- Si aparecieron colonias de diferentes de color azul-verde no son *S. aureus* o negras pueden o no ser *S. aureus*. Si dentro de las 24 horas no aparecen colonias, el ensayo se da por concluido.

Empleo del Disco Staph Express

- Si dentro de las 24 horas apareció colonias distintas a las de color roja-violeta, se empleó el disco.



- Se sacó un disco del estuche agarrándolo por la lengüeta, se elevó el film superior y procedió a colocar el disco sobre el film inferior encima de las colonias abarcando toda el área circular. Se bajó el film superior.
- Se deslizó los dedos por encima del film superior incluyendo los bordes para asegurar el contacto con el gel, eliminando las burbujas.
- Se incubó en una estufa por un lapso de 3 horas a una temperatura de 35°C.
- Para la interpretación, se contó las zonas rosas como presencia de *Staphylococcus* haya o no haya colonias. El color rosa se debe al indicador que contiene el disco que es el azul-O toluidina.

#### **2.3.2.4. Recuento de Mohos y Levaduras en placa petrifilm 3M**

Las placas petrifilm para recuento de mohos y levaduras, permitieron el crecimiento de las mismas permitiendo el recuento. (Petrifilm 3M, 2003)

La siembra se realizó de la siguiente manera: (Petrifilm 3M, 2003)

- SE colocó la placa de petrifilm 3M para recuento de mohos y levaduras dentro de la cámara de reflujo, se levantó el film superior y con una pipeta colocada en forma perpendicular se añadió 1ml de muestra sobre el film inferior.
- Se bajó despacio el film superior impidiendo que se formen burbujas.
- Con el aplicador para mohos y levaduras con la cara lisa hacia abajo se presionó en el centro sobre el film superior hasta distribuir el inoculo formando un circulo uniforme. No deslizar o girar el aplicador a través de la película.
- Se retiró el aplicador y se dejó en reposo por un minuto hasta que se solidifique el gel.

Para la incubación se siguió los siguientes pasos: (Petrifilm 3M, 2003)

- Se colocó las placa petrifilm 3M a temperatura ambiente de 25 a 28 °C durante 48 horas, si en el transcurso de este tiempo aparecen colonias débiles adicionamos 12 horas para poder tener una lectura correcta.

La interpretación se hizo de la siguiente manera:

- Las colonias de levaduras tienen las siguientes características: son colonias pequeñas, tienen bordes definidos, rosa-bronce a azul-verde en color, las colonias tienen 3

dimensiones y un color uniforme. Se contarán en la placa las colonias que cumplan con estas características.

- Las colonias de mohos tienen las siguientes características: son colonias grandes, sus bordes son difusos, el color es azul-verde o variable según el tiempo de incubación, las colonias son planas con un centro oscuro con bordes difusos. Se contarán en la placa las colonias que cumplan con estas características.

### **2.3.3. Descripción de la morfología macroscópica de las colonias en Agar Mueller Hinton.**

Para la observación macroscópica se tomó los siguientes puntos:

- Coloración de las colonias
- Producción de gas o de ácido.
- Forma de las colonias: Redondas, cóncavas, convexas, irregulares.
- Tamaño de las colonias: grande, pequeña. (Petrifilm 3M, 2003)

### **2.3.4. Estabilizar el Aislado bacteriano**

#### **2.3.4.1. Aislamiento de Aerobios**

- Dentro de la cámara de reflujo, se levantó el film superior de la placa de petrifilm 3M para recuento de aerobios y se seleccionaron 5 colonias del gel las más representativas.
- Con un asa de platino estéril, se cogió la primera colonia y se sembró en agar Mueller Hinton realizando un repique, se esterilizó el asa en una llama y luego se deja que se enfríe y se procedió a coger la siguiente colonia realizando el mismo procedimiento.
- Una vez terminada la siembra de las 5 colonias en el agar Mueller Hinton, se procedió a sellar la caja con parafilm, se marcó con nombre y fecha e se incubó boca abajo en una estufa a 35°C durante 24 horas.
- Transcurrido las 24 horas de incubación se sacó la caja y se colocó dentro de la cámara de reflujo y se realizó un re-aislamiento, con un asa de platino se tomó del agar anterior de Mueller Hinton las colonias y se realizó el repique de las 5 colonias en otra caja de Agar Mueller Hinton. Se selló, se marcó e se incubó boca abajo a 35°C durante 24 horas. Se repitió el procedimiento por dos ocasiones hasta estabilizar el aislado bacteriano. (Petrifilm 3M, 2003)

#### 2.3.4.2. *Aislamiento de Coliformes Totales*

- Se sacó la placa petrifilm 3M para recuento de coliformes totales y se colocó dentro de la cámara de reflujo, se seleccionó cinco colonias: dos colonias no productoras de gas y 3 colonias productoras de gas.
- Se levantó el film superior de la placa petrifilm 3M y con un asa de platino estéril se procedió a tomar la primera colonia y se sembró haciendo un repique en una caja con agar Miuller Hinton, se esterilizó el asa a la llama se dejó enfriar y se procedió a tomar la siguiente colonia repitiendo el mismo procedimiento con la que sembramos la colonia anterior hasta sembrar las cinco colonias.
- Una vez que se terminó de sembrar las cinco colonias, se selló la caja con parafilm, se marcó con el nombre y fecha se incubó boca abajo a 35°C durante 24 horas.
- Después de las 24 horas de incubación, se sacó la caja de Miuller Hinton con las bacterias aisladas y se colocó dentro de la cámara de reflujo para realizar un reaislamiento en otra caja de agar Miuller Hinton haciendo los cinco repiques. Se Selló, se marcó e se incubó a la misma temperatura a la que estaba durante el mismo tiempo. Se repitió el procedimiento hasta estabilizar el aislado bacteriano. (Petrifilm 3M, 2003)

#### 2.3.4.3. *Aislamiento de Staphylococcus aureus.*

- Se sacó la placa petrifilm 3M para *S. aureus* de la estufa y se colocó dentro de la cámara de reflujo, se seleccionó 5 colonias las más representativas.
- Se levantó el film de la placa petrifilm y con un asa de platino estéril se tomó la primera colonia y se sembró en una caja de agar Miuller Hinton realizando un repique, se esterilizó el asa a una llama y se dejó que se enfrié, se tomó la siguiente colonia de la placa con el asa y se procedió a realizar el mismo procedimiento con la que sembramos la anterior colonia.
- Una vez que se finalizó la siembra de las cinco colonias, se selló la caja con parafilm, se marcó con el nombre y fecha y se incubó boca abajo a 35°C durante 24 horas.
- Una vez que se cumplió con el tiempo de incubación, se sacó la caja de Miuller Hinton con las bacterias aisladas y se procedió a resembrar en otra caja de agar Miuller Hinton, se realizó el mismo proceso por dos ocasiones más hasta estabilizar el aislado y obtener los mismos resultados. (Petrifilm 3M, 2003)

### **2.3.5. Purificación por Siembra por Agotamiento**

Una vez que se estabilizó el aislado bacteriano, se tomó las colonias más peculiares de cada caja para realizar una siembra por agotamiento para obtener una cepa pura. (Petrifilm 3M, 2003)

- Se etiquetó la placa con la colonia con el código de la colonia aislada y se dividió en tres cuadrantes rotulados en la parte inferior de la placa.
- Se Flameó el asa de siembra, se esperó que se enfrié y del último repique que hicimos cogimos una colonia peculiar.
- Se abrió la tapa de la placa con el agar de Mueller Hinton y se procedió a realizar estrías en el primer cuadrante con el asa con delicadeza para evitar romper el medio de cultivo.
- Se giró la placa, se flameó nuevamente la asa, se dejó que se enfrié y se volvió a hacer estrías arrastrando el inóculo de la primera siembra que realizamos y se volvió a repetir lo mismo con el último cuadrante.
- Se cerró la tapa y se selló con parafilm, se marcó la placa con el código de bacteria y fecha y se incubó boca abajo a una temperatura de 35°C durante 24 horas.

Este procedimiento se realizó con las bacterias más peculiares, obtenidas las colonias puras las sembramos en una caja de Mueller Hinton realizando repiques para su conservación.

### **2.3.6. Tinción Gram**

Se realizó la tinción Gram para conocer si la colonia aislada está realmente aislada, es decir si en la muestra encontramos Bacilos o Cocos Gram (-) o Gram (+). (SAMTAMBROSIO, 2009, pp. 2-5).

- En un portaobjetos, se colocó una gota de suero fisiológico.
- Con el asa de platino estéril, se cogió una colonia aislada y se esparció en el suero fisiológico realizando la fijación de la colonia mediante calor.
- Se procedió a teñir con 1ml del colorante violeta cristal, dejando que actué por un minuto, después se lavó el exceso con agua destilada.
- Luego se añadió una solución Yodada, dejando actuar por uno o dos minutos, el exceso se retiró con la ayuda de una pizeta llena de agua destilada.
- Se colocó el decolorante que es el alcohol etílico/cetona y se dejó que actué por unos 20 segundos y lavamos.
- Por último, se añadió el colorante safranina por uno o dos minutos y el exceso se eliminó con agua destilada.
- Se dejó que se seque y se procedió a observar las bacterias al microscopio. (SAMTAMBROSIO, 2009, pp. 2-5).

### **2.3.7. Identificación bacteriana**

Las colonias puras tienen que pasar por varias pruebas para su posterior identificación.

#### **2.3.7.1. Prueba de la Catalasa**

La mayoría de las bacterias aerobias contienen la enzima catalasa. Estas bacterias descomponen el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. La prueba es positiva cuando existe desprendimiento de oxígeno en forma de burbujas. (MACFADDIN, 2004, p. 56)

El procedimiento fue el siguiente:

- En un portaobjetos, se colocó una gota de agua oxigenada, con ayuda de una pipeta pasteur.
- Se suspendió la colonia pura
- Se observó la formación de burbujas.

#### **2.3.7.2. Prueba de la oxidasa**

Determina la presencia de Citocromo C, el mismo que se oxida al reaccionar con la N, tetrametil, 1-4, fenilendiamina. La oxidación se detecta como color azul dando un resultado positivo. (MACFADDIN, 2004, p. 95)

El procedimiento fue:

- Colocamos una tirilla de oxidasa sobre la colonia bacteriana.
- El resultado es positivo si la tirilla cambia a azul antes de los 10 segundos.

#### **2.3.7.3. Identificación de Cocos Gram Positivos**

##### **2.3.7.3.1. Agar Manitol Salado**

Se sembraron las colonias en agar manitol que es un medio de cultivo selectivo y diferencial, utilizado para el aislamiento y diferenciación de estafilococos. Es selectivo debido a su alta concentración salina. Los estafilococos coagulasa positiva hidrolizan el manitol cambiando color del medio de rojo a amarillo. Los estafilococos coagulasa negativa no cambian el medio. (AGUINAGA, 1996, pp. 144 -174)

El procedimiento utilizado fue:

- Se tomó las colonias del Agar Mueller Hinton con un asa de platino estéril y se inoculó en las placas de agar manitol mediante estrías.
- Se incubó en la estufa a 35°C durante 24 horas, en aerobiosis.

La interpretación se realizó de la siguiente manera:

- Crecimiento de la colonia excelente, característica del medio amarillo, microorganismo *Staphylococcus aureus*.
- Crecimiento de la colonia buena, característica del medio roja, microorganismo *Staphylococcus epidermidis*.

#### **2.3.7.4. Identificación de Bacilos Gram Positivos**

##### **2.3.7.4.1. Agar Almidón**

El almidón es una molécula muy compleja y para su asimilación las bacterias deben elaborar una enzima la amilasa que hidroliza el almidón con formación de maltosa. (AGUINAGA, 1996, pp. 144 -174)

El procedimiento empleado fue:

- Se tomó la colonia del Agar Mueller Hinton con un asa de platino estéril y se inoculó en la placa de agar almidón mediante estrías.
- Se incubó a 35°C durante 8 días. Haciendo control cada dos días.
- Cuando el desarrollo de la colonia fue suficiente, se añadieron 3 gotas de solución yodo yodurado.

La interpretación se hizo de la siguiente manera:

- Se considera positivo la hidrólisis de almidón cuando alrededor de la colonia aparecía una zona clara y es negativo si se forma un color azul porque no hubo la hidrólisis del almidón.

#### **2.3.7.4.2. Agar Gelatina**

Las bacterias elaboran enzimas proteolíticas llamadas gelatinasas que licuan la gelatina. (AGUINAGA, 1996, pp. 144 -174)

Se siguió el siguiente procedimiento:

- Con un asa de platino estéril se tomó una colonia del agar Miuller Hinton y se inoculo mediante estrías en la placa de agar gelatina.
- Se incubo en la estufa a 35 °C durante 8 días.
- Cuando la colonia estuvo suficientemente desarrollada se recubrió la superficie del medio con unas gotas de cloruro mercúrico.

La interpretación se realizó de la siguiente manera:

- Se consideró positiva la reacción si alrededor de la colonia se formaba una zona clara.

#### **2.3.7.5. Identificación de Bacilos Gram Negativos**

##### **2.3.7.5.1. Agar E.M.B.**

Este medio es utilizada para el crecimiento selectivo de bacterias Gram (-), especialmente de la familia Enterobacteriaceae. Este agar utiliza como indicador eosina azul de metileno, que ejerce un efecto inhibitorio sobre las bacterias Gram (+).(AGUINAGA, 1996, pp. 144 -174)

El procedimiento fue:

- Se tomó un inoculo con el asa de platino del Agar Miuller Hinton y se sembró haciendo estrías sobre la superficie del Agar E.M.B.
- Se incubó a 35°C durante 24 a 48 horas.

La interpretación se realizó de la siguiente manera:

- Si el color de la colonia presenta un color verde con brillo metálico y centro negro azulado, el microorganismo es una *Escherichia coli*.
- Colonias incoloras puede tratarse de cualquier otro microorganismo.

### 2.3.7.5.2. *Agar MacConkey*

Es un medio que permite el crecimiento de bacterias Gram (-), aporta todos los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano, es similar a al Agar E.M.B., ya que contiene cristal violeta y mezcla de sales biliares que impide el desarrollo de la mayoría de bacterias Gram (+). Además contiene lactosa carbohidrato fermentable. (MAC CONKEY AGAR, 2010)

El procedimiento que se realizó fue:

- Se inoculó con un asa de platino la colonia tomada del Agar de Miuller Hinton al Agar MacConkey haciendo una siembra por estrías.
- Se incubó a 35°C durante 24 horas.

La interpretación se hizo de la siguiente forma:

- Si los microorganismos son fermentadores de la lactosa se observaran como colonias rosadas-rojizas.
- Si los microorganismos no son fermentadores de la lactosa se observaran colonias del color del medio y transparentes.

### 2.3.7.5.3. *Agar Salmonella Shigella*

Es un medio diferencial y selectivo que se utiliza cuando se sospecha la presencia de *Salmonella spp.* y de otras especies de *Shigellas spp.* El agar contiene varios nutrientes como la pluripeptona, extracto de carne que permiten el desarrollo bacteriano. Sales biliares y verde brillante que inhiben el crecimiento de bacterias Gram (+) y de coliformes, permitiendo el desarrollo de *Proteus spp.* La Lactosa que es un carbohidrato fermentable. El tiosulfato de sodio que permite observar la producción de gas sulfhídrico H<sub>2</sub>S. El rojo neutro que es el indicador de pH. (SALMONELLA-SHIGELLA., 2010)

Se siguió el siguiente procedimiento:

- Se sembró la colonia pura realizando estrías sobre la superficie del agar.
- Se incubo a 35°C durante 24 horas.

La interpretación se hizo de la siguiente manera:

- Si se observan colonias rosadas o rojizas son microorganismos fermentadores de lactosa.
- Si se observan colonias del color del medio e incoloras son microorganismos no fermentadores de la lactosa.



- Si se observan colonias con centro negro son microorganismos productores de H<sub>2</sub>S.

#### **2.3.7.5.4. Agar Movilidad**

Es una agar semisólido que permite detectar la movilidad de los microorganismos. (BOQUET, et. al., 1995, pp. 44-148)

El procedimiento fue el siguiente:

- Con una aguja de inoculación recta se tomó una colonia del cultivo de 24 horas en medio sólido, se sembró por punción profunda en el centro del tubo de agar movilidad. Es importante que la siembra se realice en línea recta.
- Se tapó los tubos con las tapas adecuadas.
- Se colocó los tubos en una gradilla e incubamos por 24 horas a 35°C.

Se hizo la interpretación de la siguiente manera:

- Los microorganismos móviles producen turbidez en el medio y el crecimiento sobrepasa la línea sembrada.
- Los microorganismos inmóviles, el crecimiento se observa solamente sobre la línea donde se hizo la siembra.

#### **2.3.7.5.5. Medio de Hugh Leifson (O.F.)**

En un medio rico en hidratos de carbono, se usa para determinar el metabolismo oxidativo-fermentativo de las bacterias Gram (-). (BOQUET, et. al., 1995, pp. 44-148)

El procedimiento fue:

- Para el estudio del microorganismo, se sembró en dos tubos del medio O.F. y se rotuló un tubo como abierto y el otro tubo como cerrado.
- Con una aguja de inoculación recta se tomó una colonia pura del cultivo de 24 horas y sembramos en los dos tubos haciendo una picadura en el centro del tubo aproximadamente de 0,6mm del fondo.
- El tubo que se rotulo como cerrado colocar de 1 a 2 ml de vaselina estéril, para incubar en anaerobiosis.
- Se tapó a los tubos con las tapas adecuadas.
- Se incubó en la estufa a 35°C durante 72 horas.

La interpretación se hizo de la siguiente manera:

- Fermentativos será cuando ambos tubos cambien de color de azul a amarillo.
- Oxidativos serán cuando el tubo abierto cambie de color de azul a amarillo
- Inertes será cuando ambos tubos no cambien de color.
- Producción de gas se puede observar en el tubo cerrado por elevación del tapón de vaselina.

Para reportar se debe informar: Producción de gas (A), ácido con gas (AG), alcalino (K) o sin cambio (-).

#### **2.3.7.8. Pruebas Bioquímicas**

Son pruebas que nos permite identificar a la bacteria por su género y especie, debido a la actividad bacteriana que presenta frente al indicador que se encuentra en el medio de cultivo. (BOQUET, et. al., 1995, pp. 44-148)

##### **2.3.7.8.1. Medio Kligler**

Se utiliza para el diagnóstico rápido y orientativo de Enterobacterias aisladas. (BOQUET, et. al., 1995, pp. 44-148)

El procedimiento fue:

- Se inoculó con una aguja, primero realizando una punción en el centro del tubo y a continuación en el pico de flauta realizar un estriamiento.
- Se incubo a 35°C durante 24 horas en aerobiosis.

La interpretación se realizó de la siguiente manera:

- Fermentación de la glucosa, cambio de color en la parte inferior de rojo a amarillo.
- Fermentación de la lactosa, cambio de color en el pico de flauta de rojo a amarillo.
- Producción de gas sulfhídrico H<sub>2</sub>S: presencia de color negro en el medio.
- Desprendimiento de gas: cuando se observa fractura o desplazamiento del medio.

##### **2.3.7.8.2. Medio SIM**

Es un medio semisólido que se utiliza para observar la movilidad, producción de indol y de sulfuro de hidrogeno de los microorganismos. (BOQUET, et. al., 1995, pp. 44-148)

El procedimiento que se siguió fue el siguiente:

- Se tomó una colonia pura con la aguja de inoculación y se sembró por punción en el centro del tubo abarcando una profundidad de  $\frac{3}{4}$  partes. Es importante que la siembra se realice en línea recta.
- Se incubó a 35°C durante 24 horas.
- Después de que incubamos, se agregó 2 a 3 gotas del reactivo de Kovacs.

La interpretación se realizó de la siguiente manera:

- Microorganismos móviles, el crecimiento sobrepasará la línea sembrada y el medio se volverá turbio.
- Microorganismos inmóviles, el crecimiento no sobrepasará la línea de siembra.
- Microorganismos productores de sulfuro de hidrógeno, el medio tomará un color negro.
- Microorganismos no productores de sulfuro de hidrógeno, el medio no presentará ningún cambio.
- Microorganismos indol positivo, presentarán un anillo en la superficie del agar de color rojo.
- Microorganismos indol negativo, no presentarán cambio de color en la superficie.

#### **2.3.7.8.3. Medio Citrato**

Bacterias usan el citrato como única fuente de carbono. El medio tiene una fuente de nitrógeno y otra fuente de carbono que es el citrato de sodio necesario para el desarrollo de la bacteria y utiliza un indicador bromo timol para el cambio de pH de verde a azul. (BOQUET, et. al., 1995, pp. 44-148)

El procedimiento a seguir fue:

- Con una aguja de inoculación, se sembró por punción y estriamiento la colonia aislada.
- Se incubó a 35°C durante 24 horas en aerobiosis.

La interpretación se hizo de la siguiente manera:

- Positivo: si existe cambio de color de verde a azul en el pico de flauta.
- Negativo: si no hay cambio de color.

#### **2.3.7.8.4. Medio Urea**

Se utilizan para bacterias que hidrolizan la urea, se utiliza como indicador el rojo fenol para cambio de pH. (BOQUET, et. al., 1995, pp. 44-148)

El procedimiento fue:

- Con una aguja de inoculación se cogió una colonia aislada, se sembró en el tubo por punción y estriamiento en el pico de flauta.
- Se incubó a 35°C durante 24 horas en aerobiosis.

La interpretación se dio de la siguiente manera:

- Positivo: cambio de color del medio de naranja a rosado.
- Negativa: ningún cambio de color del medio.

#### ***2.3.7.9. Identificación de Galería API***

Son un sistema estandarizado rápido, eficaz que permite realizar varias pruebas a la vez para la identificación de bacterias Gram (-), consta de 21 test bioquímicos estandarizados y miniaturizados y una base de datos. La galería API 20E consta de 20 pocillos con diferentes sustratos deshidratados, cada pocillo es una prueba bioquímica distinta. (DOMÍNGUEZ, 2006)

El procedimiento a seguir fue el siguiente: (DOMÍNGUEZ, 2006)

- Se tomó una cepa pura de cada microorganismo colocándola dentro de un tubo con 5ml de suero fisiológico al 1% y se homogenizó.
- Se alzó la tira transparente que recubre los pocillos y con una pipeta de 1mL se colocó la muestra homogenizada en cada pocillo de las Galerías API 20E.
- Se colocó 1 gota de aceite mineral en los pocillos que presentan una línea negra alrededor de la boca del pocillo, solo en los pocillos que tienen línea negra alrededor no en los pocillos que tienen líneas entrecortadas.
- Se selló con la misma tira transparente que estaban recubiertos los pocillos.
- Se incubó a 35°C durante 24 horas.

La interpretación se realizó de la siguiente manera: (DOMÍNGUEZ, 2006)

- Se observó el cambio de color de cada pocillo comparando con la base de datos y se anotó si el resultado es positivo o negativo.
- Si existen varios pocillos positivos necesitamos añadir ciertos reactivos para revelar los test.
  - Al pocillo TDA (Triptófano desaminasa): añadir una gota de  $\text{FeCl}_3$  al 10% observar cambio de color, positivo color marrón oscuro.

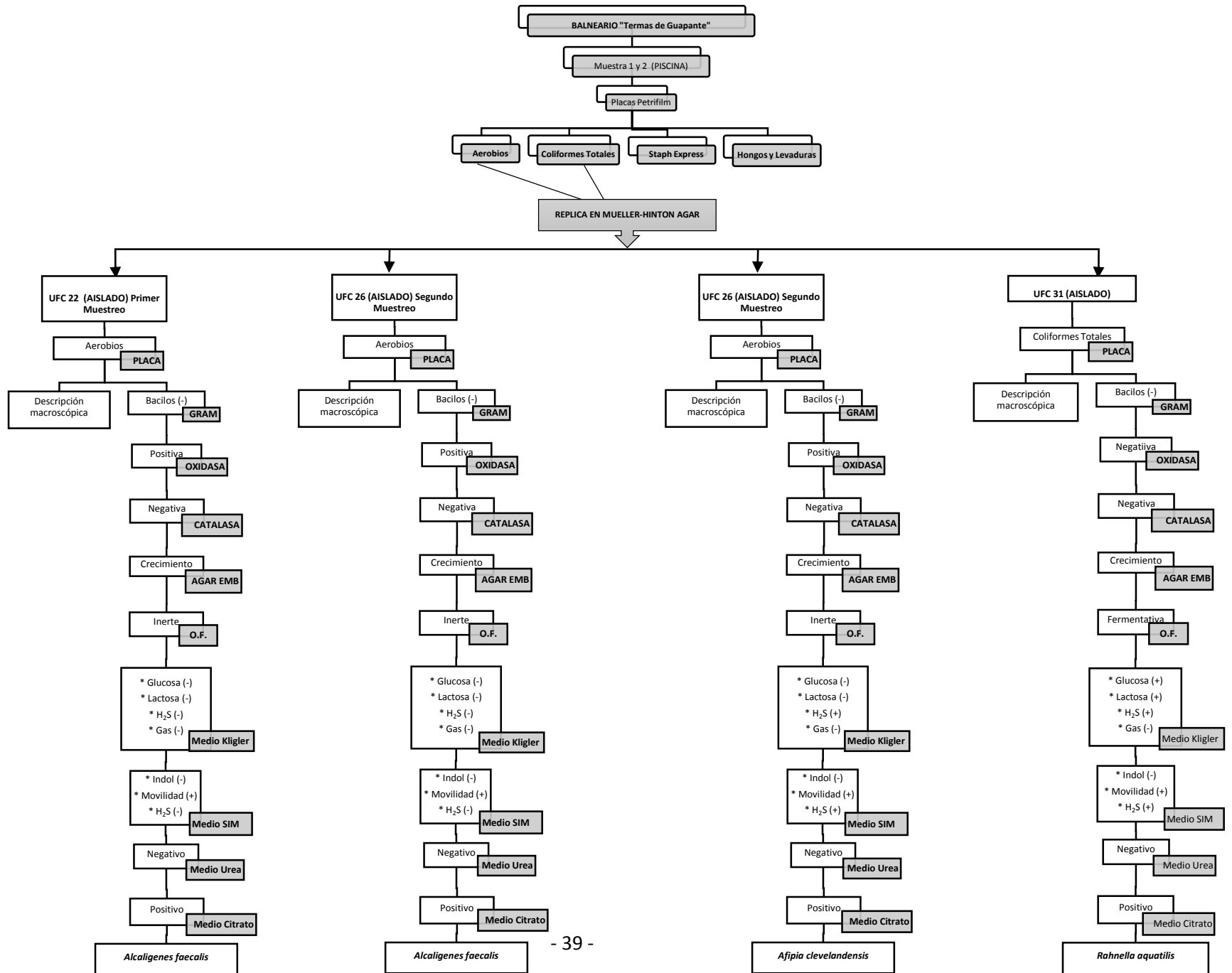
- Al pocillo VP (Producción de acetoina): Añadir una gota del reactivo KOH al 40% y una gota del reactivo C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH observar cambio de color, positivo rosa fuerte en 5 minutos.
- Al pocillo IND (Producción de Indol): añadir una gota del reactivo de Kovac's, observar cambio de color, positivo presencia de un anillo de color rojo.
- Al pocillo Oxidasa: añadir una gota del reactivo tetrafenilendiamina, observar cambio de color, positivo color azul.
- Anotar los datos obtenidos como positivo o negativo comparando con la base de datos. (DOMÍNGUEZ, 2006)

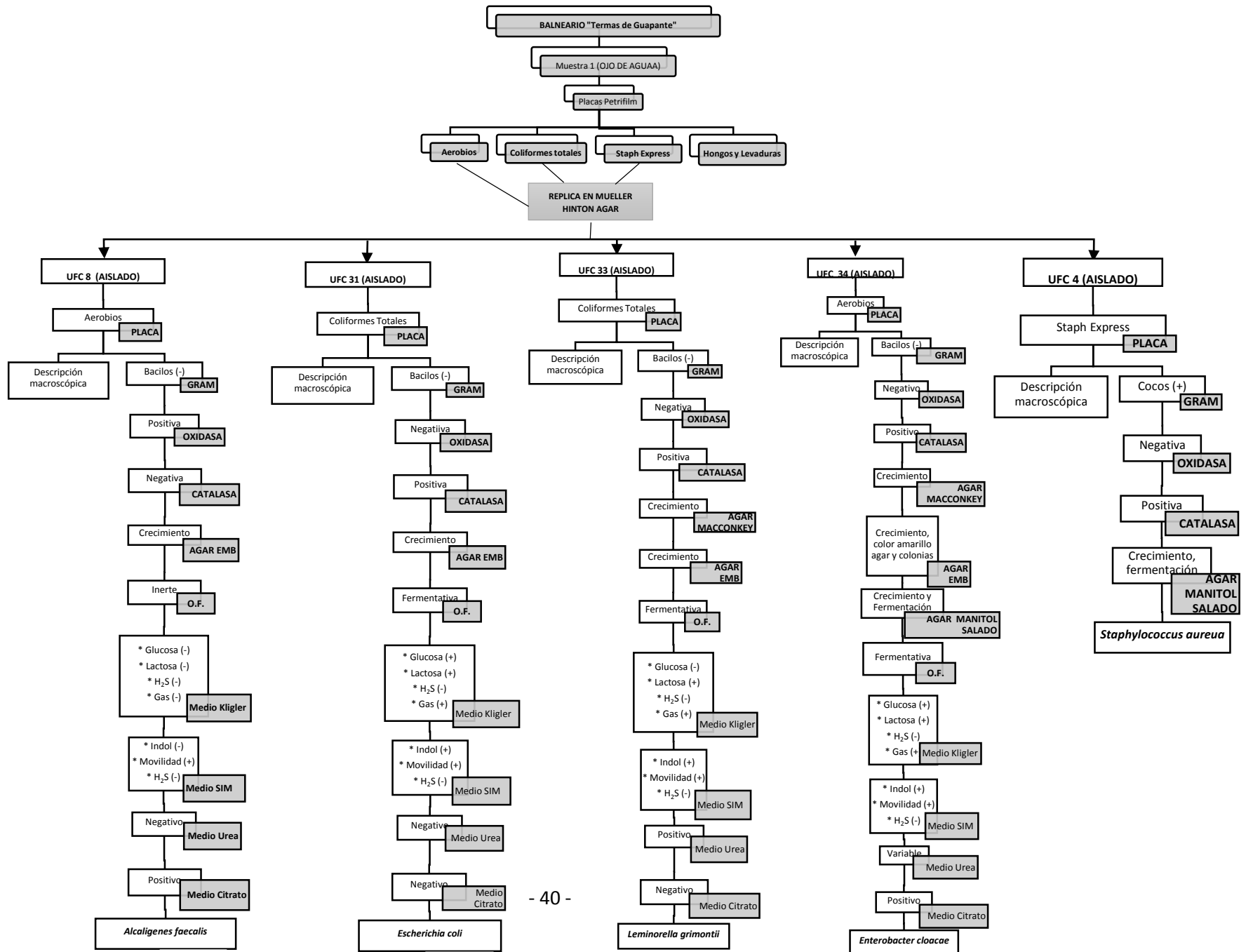
La interpretación se realizó de la siguiente manera: (DOMÍNGUEZ, 2006)

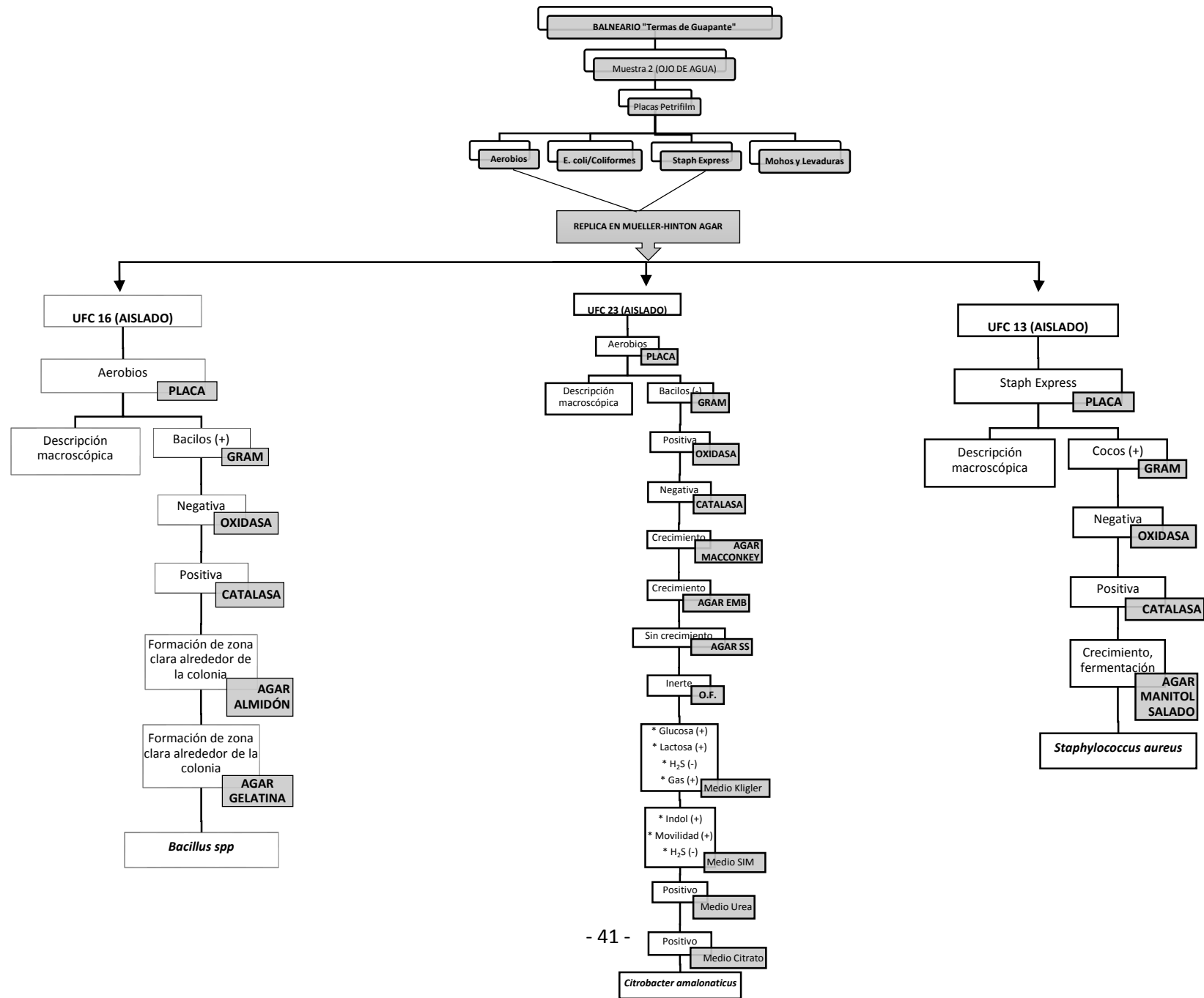
- Si la reacción es negativa se pone 0.
- Si la reacción es positiva se pone: 1 si el primer pocillo de un triplete, 2 si es el segundo, 4 si es el tercero.
- Se suman los valores obtenidos de cada triplete y se obtiene un código.
- Con este código se busca en la tabla de identificación de especie de que microorganismo se trata. (DOMÍNGUEZ, 2006)

### **2.3.8. Esquematización del procedimiento para la identificación de cada bacteria aislada.**

(Realizado por: Viviana M. Cruz C.)









## CAPÍTULO III

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

#### 3.1. Análisis, interpretación y discusión de datos

La medición de los parámetros del agua se realizó mediante la utilización de un multiparámetro de HANNA modelo HI98129 y para la obtención de los resultados microbiológicos se utilizó la media aritmética para sacar un promedio del número de colonias que se obtuvo de las muestras recolectadas para el análisis del agua tanto del punto de emergencia como de la piscina del complejo de aguas termales de “Guapante”.

##### *3.1.1. Propiedades fisicoquímicas del agua termal de “Guapante”*

Al realizar la medición de los parámetros del punto de emergencia con el multiparámetro HANNA, se obtuvo que la temperatura es de 26°C, pH 7.6, conductividad de 1010µs/cm, cantidad de sólidos disueltos de 654; valores que coinciden notablemente con el estudio fisicoquímico realizado por el INAMHI en octubre del 2013. Ver **Cuadro 7.2**. Al comparar los datos obtenidos se confirmó que el tipo de agua es bicarbonatada magnésica e hipotermal. Según un informe científico del Instituto de Investigación de Aguas y Salud, dice que el consumo de estas aguas minerales bicarbonatadas parecen aumentar el pH de la orina, disminuye los niveles de aldosterona favoreciendo el aumento de excreción urinaria, también actúa alcalinizando la sangre, facilita la salida de la bilis al intestino y como un antiácido en el estómago, entre otras.

En el estudio no solo se midió los parámetros del punto de emergencia sino también de la piscina donde se obtuvo una temperatura de 23°C, pH 6,5, conductividad de 1130µs/cm, cantidad de sólidos disueltos de 689. Ver **Cuadro 7.2**. La temperatura baja dos grados por el trayecto que debe pasar hasta llegar a desembocar en la piscina, el pH se ve aumentado por la cantidad de minerales que se encuentran disueltos, aumentando también su conductividad. Las bacterias presentes en estas aguas pueden variar considerablemente los parámetros fisicoquímicos de la piscina.

En el inventario de fuentes termales del Ecuador realizado por el INAMHI encontramos que en la Provincia de Carchi, existe un balneario con tipo de agua bicarbonatada magnésica hipotermal con similares características que el agua hipotermal de “Guapante”: temperatura de 22°C, pH de

6.5, conductividad de 418 $\mu$ s/cm, dureza de 418mg/l y con una cantidad de sólidos totales disueltos de 270,446; así también tenemos que en un punto más cercano en la Provincia de Chimborazo, encontramos el balneario “Los Elenes” agua termal afín a la de estudio con una temperatura de 22,70°C, pH de 7,8, conductividad de 1938 $\mu$ s/cm, dureza de 732mg/l y cantidad de sólidos totales de 1253, 883, es decir en el Ecuador existen varios puntos de aguas hipotermas de tipo bicarbonatada magnésica a excepción de algunas que son bicarbonatadas sódicas o cálcicas dependiendo del lugar de donde provienen.

En comparación con una fuente hipertermal de la Provincia de Tungurahua de donde procede nuestra vertiente tenemos que en el balneario de “Cunanyacu”, las características del agua son diferentes: pH 8,1, temperatura de 40,30°C, conductividad de 4530 $\mu$ s/cm, dureza de 682mg/l y cantidad de sólidos totales de 2930,91, se puede observar que los valores son superiores a los del balneario de Guapante debiéndose a la zona en la que se encuentra.

Otros análisis fisicoquímicos realizados por TORIJA Esperanza, GARCÍA Mercedes, TENORIO M., en España en las aguas del balneario del Raposo, afirman que las aguas de este balneario son de tipo bicarbonatadas cálcicas con una temperatura de 17°C, mineralización débil y dureza de 300mg/l. El agua del balneario de Guapante tiene una dureza de 317mg/l, mineralización media determinaciones hechas por el INAMHI, según CASARES et al. está dentro los rangos de 220 a 320 mg/l. que corresponde a las aguas con poca dureza, coincidiendo con datos obtenidos en este balneario con similares características.

### ***3.1.2. Determinación del número de bacterias aerobias mesófilas heterótrofas.***

En un análisis microbiológico de agua, realizado en el año 2013 por DE LA ROSA JORGE María, et al. en el Balneario del Raposo en España, determinaron un número de 34UFC/ml de bacterias aerobias mesófilas heterótrofas en el manantial, mientras que el número promedio de colonias de bacterias aerobias viables heterótrofas obtenidas en el balneario de Guapante fue de 1415 UFC/ml, es decir en el Balneario del Raposo el número de bacterias es menor a 100 UFC/ml mientras que en el balneario de Guapante el número supera a los 100UFC/ml.

En otros estudios realizados en España, en el año 2008 por MOSSO M., et al. tenemos que en el punto de emergencia del agua del Balneario de Valdelateja, el número de bacterias aerobias heterótrofas viables detectadas, ha sido inferior a 100UFC/ml. En estudios microbiológicos realizados en el punto de emergencia del balnearios de Jaraba en el año 2004 por DE LA ROSA María., et al. se obtuvo un conteo de número de colonias de 10UFC/ml, comparando con el

resultado obtenido en el punto de emergencia del balneario de Guapante, el valor es 100 veces mayor es decir supera a los valores obtenidos en los otros manantiales. Lo que evidencia la eminente contaminación que existe en el punto de emergencia del Balneario de Guapante. Ver **Cuadro 8.2.**

### ***3.1.3. Determinación del número de coliformes totales y fecales.***

En estudios realizados por DE LA ROSA María et al., en el año 2004 y 2013 en los balnearios de Jaraba y el Raposo, respectivamente. Se encontró que las aguas de estos manantiales estaban exentas de microorganismos de interés sanitario como son coliformes totales y fecales. MOSSO María et al., en el año 2008 en el Balneario Valdelateja da a conocer que este manantial no presentan microorganismos indicadores de contaminación fecal que pudiesen causar enfermedades al usuario que visite estas aguas, cumpliendo con la normativa de consumo humano.

En el balneario de Guapante, se obtuvo un recuento promedio de coliformes totales de 361 UFC/ml y un número promedio de coliformes fecales de 4,5 UFC/ml indicando que existe contaminación fecal. Ver **Cuadro 9.2.** En el balneario no existe un control adecuado de sus instalaciones, la existencia de microorganismos patógenos pueden transmitirse del agua al ser humano ya sea por vía oral, respiratoria o tópica causando enfermedades graves, por lo que es necesario tomar medidas para impedir que sigan existiendo esta clase de microorganismos y realizar análisis periódicos del agua.

### ***3.1.4. Determinación de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas*.***

La existencia de *Staphylococcus aureus* indica que estos microorganismos halófilos han sido capaz de adaptarse a la salinidad media de estas aguas, tanto las *Pseudomonas* como los *Staphylococcus aureus* son considerados como bacterias patógenas, es decir causantes de enfermedades. Según estudios realizados por DE LA ROSA María et al., y por MOSSO María et al., en los manantiales de los Balnearios de Jaraba, el Raposo y Valdelateja, no se han encontrado bacterias patógenas (*Pseudomonas*, *Staphylococcus aureus*).

En el estudio realizado en el Balneario de Guapante, se obtuvo un recuento de *Staphylococcus* de 23,75 UFC/ml, la presencia de bacterias patógenas en el agua indica contaminación y es necesaria su eliminación mediante un total aislamiento evitando infiltraciones de aguas superficiales, así como una limpieza y desinfección del contenedor y canalización. Ver **Cuadro 10.2.**

### **3.1.5. Determinación de número de Hongos y Levaduras**

Según DE LA ROSA María et al. en el año 2004, afirma la existencia de hongos y levaduras en manantiales mineromedicinales aunque es poco frecuente, diferentes autores también han encontrado estos microorganismos en diferentes manantiales de aguas termales, la mayoría proceden del suelo adaptándose a condiciones de este medio acuático. En la mayoría de trabajos de España el número de recuento de hongos es de 10UFC/ml y levaduras de 1UFC/ml.

En Ecuador en el Balneario de Guapante se obtuvo un recuento de 8,75 UFC/ml de hongos y un 12,25UFC/ml de levaduras, comparando con los datos obtenidos en los manantiales de España, podemos decir que el número de hongos está dentro del rango, mientras que el número de levaduras es 10 veces mayor. La presencia de hongos y levaduras se debe a que el agua del manantial está en contacto con el aire y con la superficie y su identificación es necesaria porque algunos géneros y especies de hongos y levaduras son patógenas siendo un riesgo para el visitante causando enfermedades micóticas en la piel. Ver **Cuadro 11.2.**

### **3.1.6. Determinación del número de bacterias Gram Negativas y Positivas predominantes.**

En estudios realizados en España por DE LA ROSA María et al. en el año 2001, en aguas hipotermas mineromedicinales del Balneario El Paraiso de Manzanera, se han aislado 34 UFC/mL predominando los bacilos Gram positivos en un 64,7% seguidos de los cocos Gram positivos en un 32,3%, encontrando principalmente bacilo del género *Bacillus* también se han encontrado en pequeña proporción bacilos irregulares del género *Corynebacterium* y *Celullomonas*. Dentro de los cocos Gram positivos la mayoría son del género *Staphylococcus* y solo se ha encontrado una cepa de bacilos Gram Negativos correspondiendo al género *Alcaligenes xyloxydans*.

En estudios realizados en los balnearios de Jaraba en el año 2008, se han aislado 254 cepas de bacterias, de las cuales el 96,1% son bacilos Gram negativas, 65% son bacterias cocos Gram positivas y un 13,8% son bacilos Gram positivos. Así tenemos, que el Balneario La Virgen predominan bacilos Gram negativos no fermentativos del género *Pseudomonas*, en el Balneario Serón, Sicilia y la Peña encontramos bacilos Gram negativos fermentadores destacando la presencia de *Enterobacter cloacae*. En todos los manantiales encontramos cocos Gram positivos del género *Staphylococcus*.

En el balneario del Raposo, estudios realizados en el año 2013, se han aislado 115 bacterias correspondiendo un 73% de bacilos Gram negativos, en un 23,5% son bacilos Gram Positivos y en un 3,5% son cocos Gram positivos. Dentro de las bacterias Gram negativas no fermentadoras tenemos a la *Pseudomonas fluorescens* y de las bacterias Gram negativas fermentadoras tenemos a la *Aeromonas hydrophila*, *Budvicia aquatica*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia ficaria* y *S. liquefaciens*. Los bacilos Gram positivos pertenecen al género *Bacillus* y los cocos Gram positivo corresponden al género *Staphylococcus*.

En el balneario de Guapante aislamos 40 cepas de bacterias viables, correspondiendo a bacilos Gram negativos un 42,5%, cocos Gram positivos un 25% y Bacilos Gram positivos un 7,5%, haciendo énfasis en los manantiales anteriormente expuestos podemos decir que en las aguas de las termas en estudio, predominan los bacilos Gram negativos adquiridos del suelo del lugar. En cuanto, a bacilos Gram negativos no fermentadores encontramos principalmente especies del género *Alcaligenes faecali*, *Afipia clevelandensis*, resultado similar a lo señalado por diversos investigadores, para aguas minerales hipotermales de España. Entre los bacilos Gram negativos fermentadores destacan *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter amalonaticus*, *Leminorella grimontii*, *Rahnella aquatilis* y *Escherichia coli*, este último es un indicador de contaminación fecal. Dentro de los cocos Gram positivos encontramos especies del género *Staphylococcus aureus*, estas bacterias se encuentran en el ambiente pero pueden llegar a los manantiales a través del aire, suelo o lluvia. También se encontraron bacilos Gram positivos del género *Bacillus* estas bacterias esporuladas proceden del suelo. Ver **Cuadro 12.2**.

### **3.1.7. Identificación bacteriana**

Mediante utilización de Pruebas Bioquímicas se identificaron las siguientes bacterias con su género y especie: Ver **Cuadro 19.2**.

- *Alcaligenes faecalis*, son bacilos Gram negativos, no fermentadores de lactosa, anaerobios facultativos, presenta movilidad, necesita de citrato como fuente de energía. Es infrecuente encontrar estas bacterias en agua, en seres humanos puede ocasionar enfermedades graves, aunque no se han descrito que patologías puede ocasionar. (VILLAMIL, et. al, 2013, p. 329)
- *Afipia clevelandensis*, son bacilos Gram negativos, no fermentadores de lactosa, anaerobio, productora de sulfuro de hidrogeno, presenta movilidad, entrando dentro del grupo de coliformes totales de la clase Proteobacteria. Está estrechamente relacionada con bacterias patógenas causantes de enfermedades en el ser humano, aunque es una bacteria descrita recientemente, aún se está investigando su patología en seres humanos debido a que su aislamiento es raro. (DRANCOURT, BROUQUI, RAOULT, 1997. Pp. 748-751)

- *Leminorella grimontii*, son bacilos Gram negativos, fermenta lactosa, productora de sulfuro de hidrogeno, presenta movilidad, pertenece a la familia Enterobacteriaceae, todas las cepas de *Leminorella* presentan resistencia (sin zona de inhibición) a la ampicilina, carbenicilina, y cefalotina. Se desconoce su importancia clínica ya que es un nuevo género que se ha aislado de muestras de heces y orina. (HICKMAN, et. al., 1985, pp. 234-237)
- *Rahnella aquatilis*, son bacterias Gram negativas, fermentan lactosa, produce sulfuro de hidrogeno, presenta movilidad, pertenece a la familia Enterobacteriaceae, la *Rahnella aquatilis* es una especie generalmente aislado de agua, rara vez se ha asociado con afecciones humanas. Esta bacteria presenta resistencia a los siguientes antibióticos, según bibliografía: ampicilina, amoxicilina-ácido clavulánico, cefalotina y cefoxitina. Y presentando sensibilidad a los siguientes antibióticos: piperacilina, azlocilina, ticarcilina, cefamandol, cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, aztreonam, imipenem, gentamicina, amikacina, tobramicina, netilmicina, trimetoprim-sulfametoxazol, ciprofloxacina y pefloxacina. (MARAKI, et. all., 1994, pp. 2706-2708)
- Las bacterias *Escherichia coli*, *Citrobacter amalonaticus*, *Enterobacter cloacae*, son bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos, productoras de gas, no esporulantes, fermentan la lactosa, pertenecen a la familia Enterobacteriaceae que conforman el grupo de los coliformes totales, pueden vivir como saprofitos independientes o como bacterias intestinales. (TORTORA, FUNKE, CASE, 2007, pp. 4-6,19). Constituyen aproximadamente el 10% de los microorganismos intestinales de personas o animales, estas bacterias para sobrevivir en un medio acuático necesitan adaptarse, la composición física y química depende para que las bacterias vivan, se reproduzcan y mueran. La presencia de coliformes fecales en el agua indica la existencia de contaminación y que las propiedades del agua se están degradando. Estas bacterias al ingresar al cuerpo humano ya sea por vía oral, respiratoria o tópica, pueden causar infecciones oportunistas, como bacteremia, infecciones de piel y tejidos blandos, además enfermedad diarreica aguda, entre las principales. (MARÍN, 2003, pp. 277-302)
- *Bacillus subtilis*, son bacilos Gram positivos, catalasa positiva, aerobios estrictos o facultativos, saprófitas, hidrolizan el almidón y la gelatina. Este género bacteriano está ampliamente distribuido en la naturaleza, encontrándolos en el agua, suelo y como flora intestinal de personas y animales; adaptándose a aguas con alta salinidad por lo que se les considera halófilos y distintos pH. Esta especie *bacillus subtilis* es utilizado en los laboratorios farmacéuticos para la obtención de bacitracina-A, utilizando este medicamento en el tratamiento para meningitis bacteriana, también produce en grandes cantidades la enzima amilasa encargada de degradar almidón en dextrina. (MÁRQUEZ, 2007, pp. 4-5)

- *Staphylococcus aureus*, son cocos Gram positivo, catalasa positiva, aerobios estrictos o facultativos, fermentan manitol. Es una especie patógena de elevada frecuencia en la naturaleza, causante de infecciones nosocomiales, resistentes según bibliografía a meticilina, piperacilina, azlocilina, ticarcilina, cefamandol, cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, aztreonam, imipenem, gentamicina, amikacina, tobramicina, netilmicina, trimetoprim-sulfametoxazol, ciprofloxacina y pefloxacina: siendo sensibles a glucopéptidos. (CAMARENA, SÁNCHEZ, 2009)

### 3.2. Presentación de resultados

#### 3.2.1. Control In Situ del agua de las termas de “Guapante” con ayuda de un multiparamétrico portátil de HANNA modelo HI98129.

**CUADRO 7-2.** Resultados del control In Situ del agua de las termas de “Guapante” obtenidas con el multiparametro HANNA modelo HI98129. Complejo de Aguas termales de Guapante. Provincia Tungurahua - Santiago de Píllaro. Febrero 2015.

DETERMINACIONES	SITIO	
	PUNTO DE EMERGENCIA	PISCINA
<b>COLOR</b>	Incolora	Incolora
<b>OLOR</b>	No Perceptible	Perceptible
<b>pH</b>	7.6	6.5
<b>TEMPERATURA AMBIENTE</b>	20°C	20°C
<b>TEMPERATURA DEL AGUA</b>	26°C	23°C
<b>SOLIDOS TOTALES</b>	654	689
<b>CONDUCTIVIDAD</b>	1010	1130

**Realizado por:** Viviana M. Cruz C.

**3.2.2. Recuento de Aerobios Mesófilos (RAM)**

**CUADRO 8-2.** Recuento de Aerobios Mesófilos presentes en las termas de “Guapante”. Laboratorio de Microbiología. Facultad de Ciencias. Riobamba. Febrero 2015.

SITIO	MUESTRA		MEDIA	VARIANZA S <sup>2</sup>	D. ESTÁNDAR S
	MUESTRA 1 (UFC/ml)	MUESTRA 2 (UFC/ml)			
OJO	860	1080	970	24200	155,563
PISCINA	1820	1900	1860	3200	56,569
<b>RESULTADOS DE AEROBIOS MESÓFILOS EN EL COMPLEJO</b>			1415	13700	106,066

Realizado por: Viviana M. Cruz C.

**GRÁFICO 1-2.** Media del Recuento de Aerobios Mesófilos de las aguas termales de “Guapante”.



Realizado por: Viviana M. Cruz C.



### 3.2.3. Recuento de Coliformes Totales y Fecales.

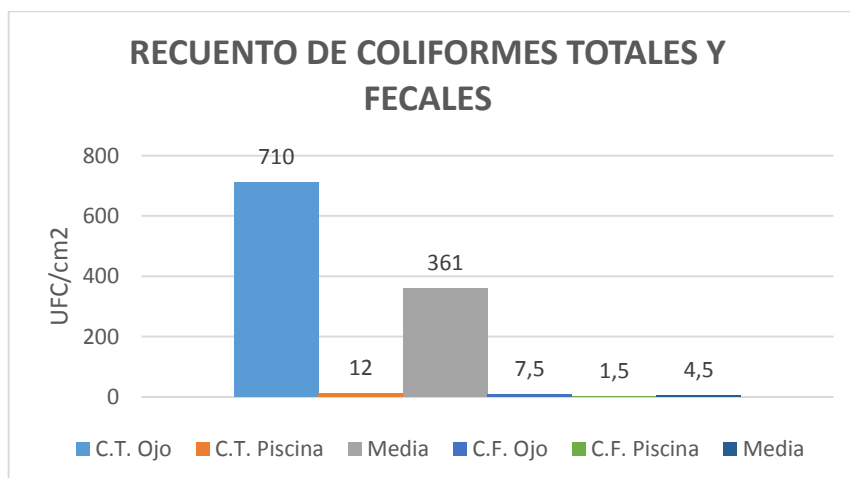
**CUADRO 9-2.** Recuento de Coliformes totales y fecales presentes en las termas de “Guapante”. Laboratorio de Microbiología. Facultad de Ciencias. Riobamba. Febrero 2015.

SITIO	MUESTRA		MEDIA	VARIANZA S <sup>2</sup>	D. ESTÁNDAR S
	MUESTRA 1 (UFC/ cm2)	MUESTRA 2 (UFC/cm2)			
OJO	640	780	710	9800	98,995
PISCINA	12	12	12	0	0,000
<b>RESULTADO DE COLIFORMES TOTALES EN EL COMPLEJO</b>			361	4900	49,497

SITIO	MUESTRA		MEDIA	VARIANZA S <sup>2</sup>	D. ESTÁNDAR S
	MUESTRA 1 (UFC/ml)	MUESTRA 2 (UFC/ml)			
OJO	8	7	7,5	0,5	0,707
PISCINA	2	1	1,5	0,5	0,707
<b>RESULTADO DE COLIFORMES FECALES EN EL COMPLEJO</b>			4,5	0,5	0,707

Realizado por: Viviana M. Cruz C.

**GRÁFICO 2-2.** Medias del Recuento de Coliformes Totales y Fecales de las termas de “Guapante”



Realizado por: Viviana M. Cruz C.

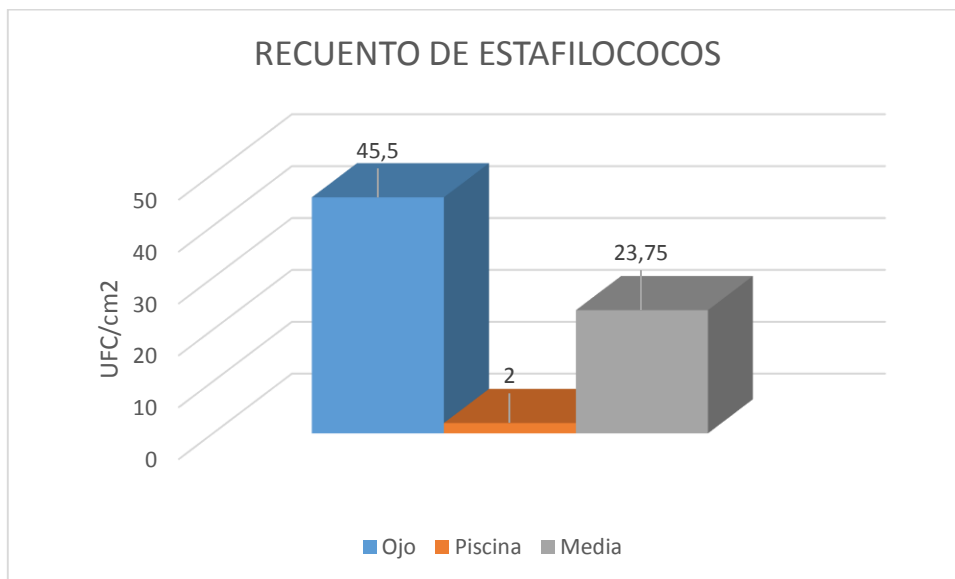
3.2.4. Recuento de *Staphylococcus*.

**CUADRO 10-2.** Recuento de *Staphylococcus* presentes en las termas de “Guapante”. Laboratorio de Microbiología. Facultad de Ciencias. Riobamba. Febrero 2015.

SITIO	MUESTRA		MEDIA	VARIANZA S <sup>2</sup>	D. ESTÁNDAR S
	MUESTRA 1 (UFC/ml)	MUESTRA 2 (UFC/ml)			
OJO	45	46	45,5	0,5	0,707
PISCINA	3	1	2	2	1,414
<b>RESULTADO DE ESTAFILOCOCOS EN EL COMPLEJO</b>			23,75	1,25	1,061

Realizado por: Viviana M. Cruz C.

**GRÁFICO 3-2.** Medias de Recuento de *Staphylococcus* de las termas de “Guapante”



Realizado por: Viviana M. Cruz C.

3.2.5. *Recuento de Mohos y Levaduras.*

**CUADRO 11-2.** Recuento de Hongos y Levaduras presentes en las termas de “Guapante”. Laboratorio de Microbiología. Facultad de Ciencias. Riobamba. Febrero 2015.

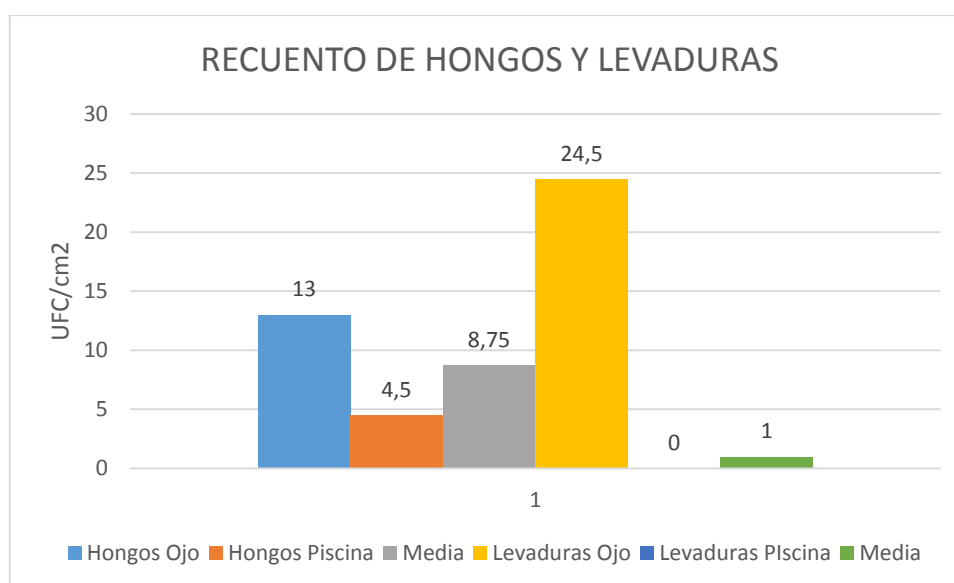
SITIO	MUESTRA		MEDIA	VARIANZA S <sup>2</sup>	D. ESTÁNDAR S
	MUESTRA 1 (UFC/ml)	MUESTRA 2 (UFC/ml)			
OJO	11	15	13	8	2,828
PISCINA	4	5	4,5	0,5	0,707
<b>RESULTADO DE HONGOS EN EL COMPLEJO</b>			8,75	4,25	1,768

Realizado por: Viviana M. Cruz C.

SITIO	MUESTRA		MEDIA	VARIANZA S <sup>2</sup>	D. ESTÁNDAR S
	MUESTRA 1 (UFC/ml)	MUESTRA 2 (UFC/ml)			
OJO	22	27	24,5	12,5	3,536
PISCINA	0	0	0	0	0,000
<b>RESULTADO DE LEVADURAS EN EL COMPLEJO</b>			12,25	6,25	1,768

Realizado por: Viviana M. Cruz C.

**GRÁFICO 4-2.** Medias de Recuento de Mohos y Levaduras de las termas de “Guapante”



Realizado por: Viviana M. Cruz C.

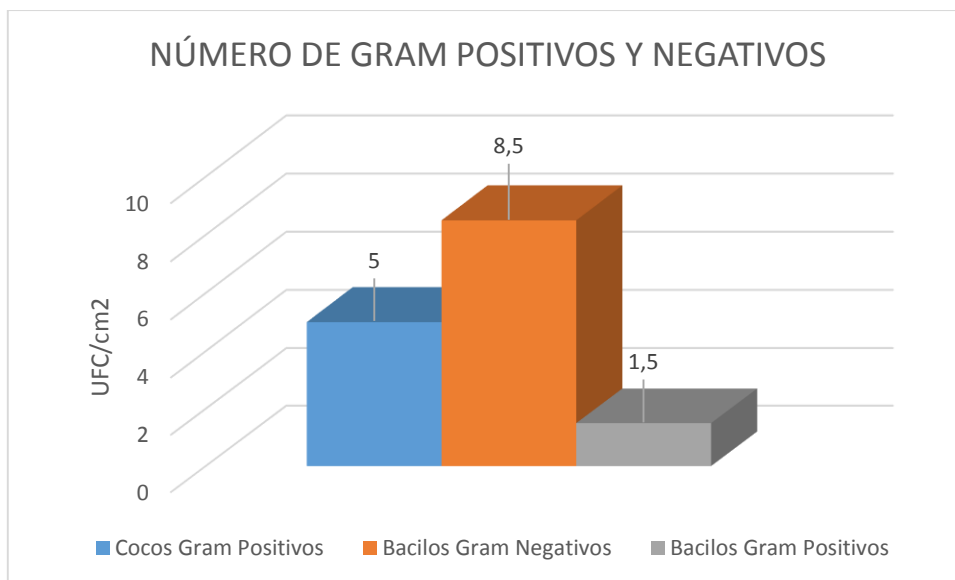
**3.2.6. Número de Gram Positivas y Gram Negativas.**

**CUADRO 12-2.** Prevalencia de Gram Positivas o Gram Negativas en el Complejo de Aguas Termales de “Guapante”. Laboratorio de Microbiología. Facultad de Ciencias. Riobamba. Febrero 2015.

TINCIÓN GRAM	COLONIAS AISLADAS		MEDIA	VARIANZA S <sup>2</sup>	D. ESTÁNDAR S
	MUESTRA 1	MUESTRA 2			
<b>Cocos Gram (+)</b>	4	6	5	2	1,414
<b>Bacilos Gram (-)</b>	9	8	8,5	0,5	0,707
<b>Bacilos Gram (+)</b>	2	1	1,5	0,5	0,707

Realizado por: Viviana M. Cruz C.

**GRÁFICO 5-2.** Medias del número de Bacterias Gram Positivas y Negativas existen las termas de “Guapante”



Realizado por: Viviana M. Cruz C.

### 3.2.7. Prueba de la Oxidasa y de la Catalasa

**CUADRO 13-2.** Prueba de la Oxidasa y Catalasa de las cepas puras. Laboratorio de Microbiología. Facultad de Ciencias. Riobamba. Febrero 2015

PETRIFILM			PRUEBAS		
NOMBRE	NUMERACIÓN COLONIA	COLOR COLONIA	COLORACIÓN GRAM	OXIDASA	CATALASA
STX	4	Violeta	Cocos Gram Positivos	Negativa	Positivo
STX	13	Violeta	Cocos Gram Positivos	Negativa	Positivo
AC	10	Rojo	Bacilos Gram Positivos	Negativo	Positivo
AC	8	Rojo	Bacilos Gram Negativo	Positivo	Negativo
EC	31	Roja con gas	Bacilos Gram Negativo	Negativo	Positivo
EC	33	Roja con gas	Bacilos Gram Negativo	Negativo	Positivo
EC	34	Roja sin gas	Bacilos Gram Negativo	Negativo	Positivo
EC	23	Roja sin gas	Bacilos Gram Negativo	Negativo	Positivo
EC	22	Roja sin gas	Bacilos Gram Negativo	Positivo	Negativo
EC	26	Roja sin gas	Bacilos Gram Negativo	Positivo	Negativo
EC	28	Roja sin gas	Bacilos Gram Negativo	Positivo	Negativo
EC	32	Roja sin gas	Bacilos Gram Negativo	Negativo	Negativo

Realizado por: Viviana M. Cruz C.

### 3.2.8. Pruebas que se realizó para la Identificación de Cocos Gram Positivos.

**CUADRO 14-2.** Pruebas para la Identificación de Cocos Gram Positivos aislados de las aguas termales de “Guapante”. Laboratorio de Microbiología. Facultad de Ciencias. Riobamba. Febrero 2015

PETRIFILM			RESULTADOS (Agar Manitol Salado)	
NOMBRE PETRIFILM	NUMERACIÓN COLONIA	COLOR COLONIA	CRECIMIENTO	COLOR DEL MEDIO
STX	4	Violeta	Excelente	Amarillo
STX	13	Violeta	Excelente	Amarillo

Realizado por: Viviana M. Cruz C.

**3.2.9. Pruebas que se realizó para la identificación de Bacilos Gram Positivos.**

**CUADRO 15-2.** Pruebas para la Identificación de Bacilos Gram Positivos aislado de las aguas termales de “Guapante”. Laboratorio de Microbiología. Facultad de Ciencias. Riobamba. Febrero 2015.

<b>PETRIFILM</b>			<b>RESULTADOS (Agar Almidón)</b>	<b>RESULTADOS (Agar Gelatina)</b>
<b>NOMBRE PETRIFILM</b>	<b>NUMERACIÓN COLONIA</b>	<b>COLOR COLONIA</b>	<b>COLOR DEL MEDIO</b>	<b>COLOR DEL MEDIO</b>
<b>AC</b>	10	Rojo	Zona Clara alrededor de la colonia	Zona Clara alrededor de la colonia

**Realizado por:** Viviana M. Cruz C.

**3.2.10. Pruebas que se realizó para la Identificación de Bacilos Gram Negativo**

**CUADRO 16-2.** Pruebas para la Identificación de Bacilos Gram Negativos aislados de las aguas termales de “Guapante”. Laboratorio de Microbiología. Facultad de Ciencias. Riobamba. Febrero 2015.

PETRIFILM			RESULTADOS (Agar EMB)	RESULTADOS (Agar Macconkey)	RESULTADOS (Agar SS)	
NOMBRE PETRIFILM	NUMERACIÓN COLONIA	COLOR COLONIA	COLOR DE LA COLONIA	LACTOSA	LACTOSA	SH2
AC	8	Rojo	Incolora	No fermentan	No fermentan	Negativo
EC	22	Roja sin gas	Incolora	No fermentan	No fermentan	Negativo
EC	26	Roja sin gas	Incolora	No fermentan	No fermentan	Negativo
EC	28	Roja sin gas	Incolora	No fermentan	No fermentan	Negativo

**Realizado por:** Viviana M. Cruz C.

**3.2.11. Número de bacterias Gram Negativas que son fermentadoras, oxidativas e inertes.**

**CUADRO 17-2.** Número de Bacterias Gram Negativas que son Fermentadoras, Oxidativas e Inertes aislados de las aguas termales de “Guapante”. Laboratorio de Microbiología. Facultad de Ciencias. Riobamba. Febrero 2015.

PETRIFILM			RESULTADOS (Medio O-F)				RESULTADOS (Medio Movilidad)
NOMBRE PETRIFILM	NUMERACIÓN COLONIA	COLOR COLONIA	FERMENTADORAS	OXIDATIVAS	INERTES	GAS	MOVILIDAD
AC	8	Rojo	Negativo	Negativo	(-)	Negativo	Positivo
EC	31	Roja con gas	(A)	Negativo	Negativo	(GA)	Negativo
EC	33	Roja con gas	(A)	Negativo	Negativo	(GA)	Positivo
EC	34	Roja sin gas	(A)	Negativo	Negativo	(GA)	Negativo
EC	23	Roja sin gas	(A)	Negativo	Negativo	(GA)	Positivo
EC	22	Roja sin gas	Negativo	Negativo	(-)	Negativo	Negativo
EC	26	Roja sin gas	Negativo	Negativo	(-)	Negativo	Negativo
EC	28	Roja sin gas	Negativo	Negativo	(-)	Negativo	Positivo
EC	32	Roja sin gas	(A)	Negativo	Negativo	(GA)	Positivo

**Realizado por:** Viviana M. Cruz C.



3.2.12. Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Enterobacterias.

CUADRO 18-2. Pruebas Bioquímicas para Identificación de Enterobacterias aisladas de las aguas termales de “Guapante”. Laboratorio de Microbiología. Facultad de Ciencias. Riobamba. Febrero 2015.

PETRIFILM			RESULTADO (PRUEBAS BIOQUÍMICAS)								
NOMBRE PETRIFILM	NUMERACIÓN COLONIA	COLOR COLONIA	Medio kligler				Medio SIM			Medio	Medio
			Glucosa	Lactosa	SH2	Gas	Movilidad	Indol	SH2	Citrato	Urea
EC	31	Roja con gas	+	+	-	+	+	+	-	-	-
EC	33	Roja con gas	-	-	+	-	+	-	+	-	+
EC	34	Roja sin gas	+	+	-	+	+	-	-	+	+/-
EC	23	Roja sin gas	+	+	-	+	+	+	-	+	+
EC	32	Roja sin gas	+	+	+	-	+	-	+	+	-

Realizado por: Viviana M. Cruz C.

**3.2.13. Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias Gram Negativas – Oxidasa Positiva.**

**CUADRO 19-2.** Pruebas Bioquímicas y Galería API utilizadas para Identificación de las bacterias Gram negativas – oxidasa positiva de las aguas termales de “Guapante”. Laboratorio de Microbiología. Facultad de Ciencias. Riobamba. Febrero 2015.

PETRIFILM			RESULTADO (PRUEBAS BIOQUÍMICAS)								
NOMBRE PETRIFILM	NUMERACIÓN COLONIA	COLOR COLONIA	Medio kligler				Medio SIM			Medio Citrato	Medio Urea
			Glucosa	Lactosa	SH2	Gas	Movilidad	Indol	SH2		
EC	8	Roja con gas	-	-	-	-	V <sup>+</sup>	-	-	+	-
EC	22	Roja con gas	-	-	-	-	V <sup>+</sup>	-	-	+	-
EC	26	Roja sin gas	-	-	-	-	V <sup>+</sup>	-	-	+	-
EC	28	Roja sin gas	-	-	+	-	+	-	+	+	-

Realizado por: Viviana M. Cruz C.

**Galería API**

Colonia 8	OXI	MOT	NIT	LYS	ORN	H <sub>2</sub> S	GLU	MAN	XYL	ONP	IND	UR	VP	CIT	TDA	GEL	MAL	IND	SOR	RHA	SUC	LAC	ARA	ADO	RAF	SAL	ARG
Result.	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Valor	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1
Valor obt.	6		0			0			0			2		0			0			0			0				

Realizado por: Viviana M. Cruz C.

3.2.14. Identificación de las bacterias aisladas.

CUADRO 20-2. Identificación del Género y Especie de bacterias aisladas de las aguas termales de “Guapante”. Laboratorio de Microbiología. Facultad de Ciencias. Riobamba. Febrero 2015.

PETRIFILM			IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS		PORCENTAJE DE IDENTIFICACIÓN
NOMBRE PETRIFILM	NUMERACIÓN COLONIA	COLOR COLONIA	GÉNERO	ESPECIE	
STX	4	Violeta	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>	100%
STX	13	Violeta	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>	100%
AC	10	Rojo	<i>Bacillus</i>	<i>subtilis</i>	90%
AC	8	Rojo	<i>Alcaligenes</i>	<i>faecalis</i>	100%
EC	31	Roja con gas	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	100%
EC	33	Roja con gas	<i>Leminorella</i>	<i>grimontii</i>	100%
EC	34	Roja sin gas	<i>Enterobacter</i>	<i>cloacae</i>	100%
EC	23	Roja sin gas	<i>Citrobacter</i>	<i>amalonaticus</i>	100%
EC	22	Roja sin gas	<i>Alcaligenes</i>	<i>faecalis</i>	100%
EC	26	Roja sin gas	<i>Alcaligenes</i>	<i>faecalis</i>	100%
EC	28	Roja sin gas	<i>Afipia</i>	<i>clevelandensis</i>	100%
EC	32	Roja sin gas	<i>Rahnella</i>	<i>aquatilis</i>	83%

Realizado por: Viviana M. Cruz C.

## CONCLUSIONES

Se determinó que el número de bacterias heterótrofas aerobias mesófilas promedio presentes en el Complejo de aguas termales de “Guapante”, es de 1001 UFC/ml tomando como eje la media es decir aproximadamente el 78,39% de las bacterias predominantes en el agua de este complejo pertenecen a este grupo mayoritario.

El número de coliformes totales promedio presentes en el complejo termal de “Guapante”, es de 361 UFC/ml es decir que aproximadamente el 20% de bacterias existentes en el agua son coliformes. El recuento de colonias para coliformes fecales promedio fue de 4,5 UFC/ml es decir que aproximadamente el 0,2% de las bacterias son bacterias patógenas que provinieron muy probablemente de heces fecales de animales que rondan la zona.

El número de colonias obtenidas de *Staphylococcus* fue de 23,75 UFC/ml aproximadamente el 1,27% de las bacterias pertenecen a este grupo siendo bacterias autóctonas de este complejo termal de “Guapante”, aunque la presencia de *Staphylococcus aureus* puede ser causante de infecciones nosocomiales.

El recuento para hongos dio como resultado 8,75 UFC/ml tomando la media como resultado general, en porcentaje viene a ser el 0,48% y el recuento para levaduras es de 12,25 UFC/ml en porcentaje un 0,67%, es decir en el complejo de aguas termales de “Guapante” existe mayor proliferación de levaduras que de hongos.

Las bacterias aisladas se identificaron por su género y especie utilizando las pruebas bioquímicas como método para su identificación. Las bacterias encontradas en su mayoría son bacterias Gram negativas entre ellas tenemos *Alcaligenes faecalis*, *Escherichia coli*, *Leminorella grimontii*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter amalonaticus*, *Afipia clevelandensis*, *Rahnella aquatilis*, entre las bacterias Gram Positivas tenemos a los *Bacillus subtilis* y a los *Staphylococcus aureus*.

Los resultados obtenidos fueron expuestos a los propietarios de este complejo de aguas termales de Guapante, dando a conocer el nivel de contaminación que existe en el agua y cómo podemos hacer para regularizar el nivel de microbiota permisible para aguas.

Entre las bacterias identificadas encontramos bacterias patógenas como el *Staphylococcus aureus*, causante de infecciones nosocomiales difíciles de tratar, en bibliografía encontramos que esta especie es resistente a la mayoría de antibióticos, por lo que llegaría a ser un problema de salud si algún visitante se contrajera esta bacteria.

En estas aguas termales existen bacterias útiles para la tecnología farmacéutica como es el *Bacillus subtilis* del cual se extrae la Bacitracina-A, que se utiliza en la meningitis aguda que es una de las infecciones nosocomiales causadas por el *Staphylococcus aureus*.

En conclusión, existe un alto nivel de contaminación en el punto de emergencia del agua, que se remedia en la piscina con la presencia de cloro residual ayudando a controlar la proliferación bacteriana.

## **RECOMENDACIONES**

Seguir realizando estudios microbiológicos de estas aguas hasta logra identificar toda la microbiota existente en estas aguas.

Estudiar las aplicaciones biotecnológicas de las bacterias, ya que pueden llegar a ser útiles para el sector industrial o farmacéutico

Realizar el estudio de patogenicidad de ciertas bacterias de las cuales aún se desconoce.

El propietario del Complejo de Aguas Termales de Guapante debe realizar un cerramiento alrededor del punto de emergencia para imposibilitar el paso de animales, frenando la contaminación y así poder asegurar la calidad de agua de este sitio turístico.

El Ecuador es un país rico en fuentes termales, por lo que se debería crear una legislación que regule el funcionamiento de estas aguas para garantizar la calidad sanitaria a los visitantes.

Las personas encargadas de la limpieza del balneario, deben realizarse un control médico ya que están en contacto directo con el agua de este manantial y además una hoja de control de limpieza de estas aguas termales.

Seguir realizando más muestreos para conocer si las medidas que se van a tomar dentro de este balneario funcionan, bajando así la carga microbiana de estas aguas termales, garantizando la salud del visitante.

## BIBLIOGRAFÍA

1. **AGUILERA**, Eduardo., “Geotermia en el Ecuador”. *Una hoja de Ruta para el desarrollo sustentable.*, [en línea]. Primera Conferencia Nacional de Geotérmica en el Ecuador. (2010). (Ecuador). pp. 15-18. [Consultado: 2014- 11- 26]. Disponible en: [http://noticias.espe.edu.ec/eaguilera/files/2012/06/Documento\\_Taller\\_Ibarra\\_-\\_Final11.pdf](http://noticias.espe.edu.ec/eaguilera/files/2012/06/Documento_Taller_Ibarra_-_Final11.pdf)
2. **AGUINAGA**, Silvia., “Manual de Procedimientos Analíticos para Aguas y Efluentes” [en línea]. *Estudio microbiológico*. (1996). (Uruguay). Laboratorios DINAMA. pp. 144-174. [Consultado: 2014- 11- 26]. Disponible en: [http://imasd.fcien.edu.uy/difusion/educamb/docs/pdfs/manual\\_dinama.pdf](http://imasd.fcien.edu.uy/difusion/educamb/docs/pdfs/manual_dinama.pdf)
3. **ARCOS**, Mireya., et. al., “Nova-Publicación Científica” [en línea]. *Indicadores Microbiológicos de la contaminación de las fuentes de agua*. (2001). Vol 3. (N° 4). pp. 72-74. [Consultado: 2015 -01 -05.]. Disponible en: [http://www.unicolmayor.edu.co/invest\\_nova/NOVA/ARTREVIS2\\_4.pdf](http://www.unicolmayor.edu.co/invest_nova/NOVA/ARTREVIS2_4.pdf)
4. **ARMIJO**, Manuel., *Compendio de hidrología*. (1968). (Barcelona). Científico Médica. pp. 302 - 345. [Consultado: 2014- 11- 26]. Disponible en: <https://revistas.ucm.es/index.php/ANHM/article/download/41405/39524>
5. **BERGEY**, David., et. al.; *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. (2001). 2.ed., (Pensylvania). San Fernando de Henares. p. 289. [Consultado: 2015 -01 -25]. Disponible en: [http://www.uiweb.uidaho.edu/micro\\_biology/250/IDFlowcharts.pdf](http://www.uiweb.uidaho.edu/micro_biology/250/IDFlowcharts.pdf)
6. **BOQUET**, Ernesto., et. al., Identificación microbiana. *Manual de Técnicas en Microbiología Clínica*. España. Garsi: 1995. pp. 44-148.
7. **BONILLA**, Miguel., “Caracterización geotérmica y consideraciones ambientales de los baños termales de sanvicente”. (Tesis) (en línea). (2003). Escuela Superior Politécnica del Litoral, Facultad de Ingeniería en Ciencias de la Tierra, (Ing. Ambiental). (Guayaquil). pp. 2-12. [Consultado: 2015 -01 -05]. Disponible en: [www.cib.espol.edu.ec/Digipath/D\\_Tesis\\_PDF/D-32087.pdf](http://www.cib.espol.edu.ec/Digipath/D_Tesis_PDF/D-32087.pdf)

8. **BUENO**, Patricio., “Análisis microbiológico del agua de la parroquia Borbón, cantón Eloy Alfaro y su asociación con la enfermedad diarreica”. (Tesis) (en línea). (2006). Universidad San Francisco de Quito. Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales. (*Baccalaureus Scientiae* (B.S.) en Biotecnología). (Quito). pp. 5-14. [Consultado: 2015 -01 -10]. Disponible en:  
[www.repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/567/1/82909.pdf](http://www.repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/567/1/82909.pdf)
9. **BUEN VIVIR.**, “Plan Nacional”. *Secretaría Nacional de Planificación y Desarrollo*. (en línea). (2013-2017). (Quito). [Consultado: 2014 -10 -25].SBN-978-9942-07-448-5. Disponible en:  
[www.buenvivir.gob.ec](http://www.buenvivir.gob.ec)
10. **BURBANO**, Napoleón., et.al.; “Aguas termominerales en el Ecuador”. *Instituto de Meteorología e Hidrología*. (en línea). (2013). (Quito). Iñaquito, p. 39. [Consultado: 2014 -10 -25]. Disponible en:  
<http://issuu.com/inamhi/docs/termalismo>
11. **CAMARENA**, Juan., **SÁNCHEZ**, Roberto.; “Departamento de Microbiología”. *Infección por Staphylococcus aureus resistente a meticilina*.(en línea). Valencia. [Consultado: 2015 -04 -12]. Disponible en:  
<https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/sarm.pdf>
12. **CAMPOVERDE**, María., **GONZÁLEZ**, Fanny.; “Determinación de Mohos y Levaduras del sistema de agua de la junta administradora de agua potable de la Parroquia Baños”. (Tesis) (en línea). Universidad de Cuenca. Facultad de Ciencias Químicas. Escuela de Bioquímica y Farmacia. (Bioquímica Farmacéutica). (Cuenca). pp. 113-132. [Consultado: 2015 -04 -12]. Disponible en:  
<http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/2472>
13. **CEVALLOS**, Carolina. “Proyecto de factibilidad para la creación de cabañas ecológicas en Nono, Provincia de Pichincha para incrementar el desarrollo turístico de la zona”. (Tesis) (en línea). (2009). (Ingeniera en Empresas Turísticas y Áreas Naturales). Universidad tecnológica equinoccial, Facultad de Turismo y preservación ambiental. Escuela de Gestión turística y preservación ambiental. (Quito). pp. 29-30. [onsultado: 2014 -10 -25]. Disponible en:  
<http://repositorio.ute.edu.ec/handle/123456789/1585?mode=full>



14. **CLAPÉS**, Benito., “Panorama actual de las Aguas Minerales y Minero-medicinales en España”. *Control de calidad de las aguas minero-medicinales*. (en línea). (Barcelona). Elsevier.S.A. pp. 75-85. [Consultado: 2014 -11 -20]. Disponible en:  
<http://aguas.igme.es/igme/publica/pdfart3/control.pdf>
15. **COMPANY**, HACH., “Procedimientos microbiológicos”. *Manual de análisis de agua*. (en línea). 3.ed., (2000). (Estados Unidos). Loveland. S.A. pp. 30-35, 54-66. [Consultado: 2014 -14 -20]. Disponible en:  
[www.hach.com/asset-get.download.jsa?id=7639984469](http://www.hach.com/asset-get.download.jsa?id=7639984469)
16. **CRUZ**, María., **HERMOSILLA**, Germán.; “Fisiología Microbiana”. *Biología de los microorganismos*. (en línea). (1992). 2.ed. (México). El Manual Moderno. pp. 15- 22. [Consultado: 2015 -01 -12]. Disponible en:  
[https://www.ucursos.cl/medicina/2010/0/MAGVIVO3/1/material\\_docente/bajar?id\\_material=277488](https://www.ucursos.cl/medicina/2010/0/MAGVIVO3/1/material_docente/bajar?id_material=277488)
17. **CUERVO**, Jeanny., “Aislamiento y Caracterización de *Bacillus spp.* Como fijadores biológicos de nitrógeno y solubilizadores de fosfatos en dos muestras de biofertilizante comerciales”. (Tesis) (en línea). (2010). (Microbiólogo Agrícola y Veterinario). Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Básicas, Carrera de Microbiología Agrícola y Bacteriana. (Bogotá). p. 8. [Consultado: 2015 -04 -12]. Disponible en:  
[repository.javeriana.edu.co/bitstream/10554/8434/1/tesis404.pdf](http://repository.javeriana.edu.co/bitstream/10554/8434/1/tesis404.pdf)
18. **DE LA ROSA**, María., et.al., “Real Academia Nacional de Farmacia”. *Microbiología de las aguas mineromedicinales de los balnearios de Jaraba*. (en línea). (2004). Vol 70. (Madrid).. p. 530-539. [Consultado: 2015 -02 -12]. Disponible en:  
<http://europa.sim.ucm.es/compludoc/AA?articuloId=417455>
19. **DE LA ROSA**, María., **MOSSO**, María.; “Real Academia Nacional de Farmacia”. *Diversidad microbiana de las aguas minero termales*. (en línea). (2001) Universidad Complutense. (Madrid). p.153. [Consultado: 2014 -10 -25]. Disponible en:  
[aguas.igme.es/igme/publica/pdfart3/diversidad.pdf](http://aguas.igme.es/igme/publica/pdfart3/diversidad.pdf)
20. **DE LA ROSA**, María., et. al., “Real Academia Nacional de Farmacia”. *Microbiología del manantial mineromedicinal del Balneario Puente Viesgo*. (en línea). (2007). Vol 73. (Madrid). pp. 253-261. [ Consultado: 2015 -02 -12]. Disponible en:  
<http://analesranf.com/index.php/aguas/article/viewFile/293/774#page=67>

21. **DE LA ROSA**, María., **MOSSO**, María., **PRIETO**, María.; “Real Academia Nacional de Farmacia”. *Microbiología del agua mineromedicinal del Balneario “El Paraíso” de Manzanera (Teruel)*. (en línea). (2001).Vol 67. (Madrid). pp. 3-11. [Consultado: 2015 -02 -12]. Disponible en:  
<http://europa.sim.ucm.es/compludoc/AA?articuloId=176527>
22. **DE LA ROSA**, María., et. al., “Real Academia Nacional de Farmacia”. *Balneario de España aguas minerales y mineromedicinales monografía XXXII EL Raposo*. (en línea). (Madrid). pp. 65-81. [Consultado: 2015 -04 -14]. Disponible en:  
[ebook.ranf.com/raposo/files/assets/basic-html/page82.htm](http://ebook.ranf.com/raposo/files/assets/basic-html/page82.htm)
23. **DOMÍNGUEZ**, Samuel., “El Laboratorio de Microbiología”. *Galería API 20E Sistemas de Identificación multipruebas*. (en línea). (2006). (Madrid). [Consultado: 2015 -01 -17]. Disponible en:  
<http://perso.wanadoo.es/microdominguez/API.htm>
24. **DRANCOURT**, Michel., **BROUQUI**, Philippe., **RAOULT**, Didier.; “*Afipia clevelandensis* Antibodies and Cross-Reactivity with *Brucella* spp. and *Yersinia enterocolitica* O:9”. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. (en línea). (1997). N° 6. Vol. 4. (Francia). PubMed Central. pp. 748-751. [Consultado: 2015 -04 -12]. Disponible en:  
<http://citeseerx.ist.psu.edu/messages/downloadsexceeded.html>
25. **ECUADOR.**, “Población y Demografía”. *Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC)*. (en línea). (2010). Quito. Macro. [Consultado: 2014 -11 -08]. Disponible en:  
<http://www.ecuadorencifras.gob.ec/censo-de-poblacion-y-vivienda/>
26. **ECUADOR.**, “Aguas”. *Instituto Ecuatoriano de Normalización (NTE INEN 1108)*. (en línea). (2011). Cuarta Revisión. Quito. [Consultado: 2014 -11 -12]. Disponible en:  
<https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.1108.2011.pdf>
27. **ECUADOR**, Agua Potable. *Instituto Ecuatoriano de Normalización (INEN)*. (en línea). (2008). Primera Edición. Quito. p. 3. [Consultado: 2014 -11 -12]. Disponible en:  
[http://www.normalizacion.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2013/11/rte\\_023.pdf](http://www.normalizacion.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2013/11/rte_023.pdf)

28. **ECUADOR**, “Ley Orgánica de recursos hídricos, usos y aprovechamiento del agua”, *Registro Oficial 305 de la ley Orgánica*. (en línea). (2014). Segundo suplemento. Quito. 5 de Agosto del Art.: 117 – 122. pp. 24-25. [Consultado: 2014 -11 -12]. Disponible en: <http://www.agua.gob.ec/wp-content/uploads/2012/10/LEYD-E-RECURSOS-HIDRICOS-II-SUPLEMENTO-RO-305-6-08-204.pdf>
29. **ESPAÑA**, Métodos Normalizados APHA. Examen microbiológico de aguas en instalaciones recreativas. *Métodos Normalizados para Análisis de Aguas Potables y Residual*. (en línea). (1992). 17 ed. pp. 1654- 1697. [Consultado: 2014 -12 -12]. Disponible en: [http://www.libinter.com/libro.php?libro\\_id=7371](http://www.libinter.com/libro.php?libro_id=7371)
30. **FAGUNDO**, Juan., **GONZÁLEZ**, Patricia., “Aguas mineromedicinales”. *Aguas Naturales, Minerales y Mineromedicinales*. (en línea). (2000). España. Universidad de Granada. pp. 3-8. [Consultado: 2014 -11 -17]. Disponible en: <http://www.sld.cu/sitios/mednat/docs/aguas.pdf>
31. **FAGUNDO**, Juan., “Origen de las aguas termales”. *Caracterización y evaluación de los yacimientos de aguas minerales y peloides de Cuba*. (en línea). (1998). Universidad de la Habana. Facultad de Farmacia. Cuba.. p. 19. [Consultado: 2014 -11 -09]. Disponible en: [http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/rehabilitacion-bal/informe\\_final\\_minsap\\_1.pdf](http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/rehabilitacion-bal/informe_final_minsap_1.pdf)
32. **GARCÍA**, Ángela., “Aguas mineromedicinales: tipos, formas de aplicación, indicaciones y contraindicaciones”. *Termalismo y Deporte*. (en línea). (2006). España-Granada. Complutense. p. 15. [Consultado: 2014 -12 -15]. Disponible en: <http://www.sld.cu/sitios/mednat/docs/aguas.pdf>
33. **GUERRERO**, Carmén., **SÁNCHEZ**, Carlos.; Procedimientos en Microbiología Clínica. *Metodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología*. (en línea). (2010). España: SBN-978-84-614-7932-0. pp. 12-19. [Consultado: 2015 -01 -12]. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia1a.pdf>
34. **HICKMAN**, F., et. al.; “Leminorella, a New Genus of Enterobacteriaceae: Identification of *Leminorella grimontii* sp. nov. and *Leminorella richardii* sp.”. *Found in Clinical*

*Specimens*. (en línea). N° 2. Vol. 21. Febrero de 1985. pp. 234-237. [Consultado: 2015 -04 -12]. Disponible en:  
<http://jcm.asm.org/content/21/2/234.full.pdf>

35. **LARREA, J.**, et. al.; Evaluación de la calidad microbiológica de las aguas del Complejo Turístico “Las Terrazas”, Pinar del Río (Cuba). *Higiene y sanidad ambiental*. (en línea). (2009). N° 455. Vol. 9. Cuba. Universidad de la Habana. pp. 492-500. [Consultado: 2015 -04 -12]. Disponible en:  
[http://salud-publica.es/secciones/revista/revistaspdf/bc5101912f2019d\\_Hig.Sanid.Ambient.9.492-504\(2009\).pdf](http://salud-publica.es/secciones/revista/revistaspdf/bc5101912f2019d_Hig.Sanid.Ambient.9.492-504(2009).pdf)
36. **LIMÓN, Alfonso.**,. Espejo cristalino de las aguas de España. *Marco de variedad de fuentes y baños*. 17 ed. España. A su Costa.2009.p. 409
37. **LLORET, Andres.**, **LABUS, Jerko.**; “Geothermal development in Ecuador: history, current status and future”. *United Nations University*. (en línea). (2013) Quito. La Geo S.A. de C.V. pp. 1-9. [Consultado: 2014 -12 -23]. Disponible en:  
[http://www.irena.org/DocumentDownloads/events/2014/June/TechnicalTraining/17\\_Lloret.pdf](http://www.irena.org/DocumentDownloads/events/2014/June/TechnicalTraining/17_Lloret.pdf)
38. **LÓPEZ, Andrés.**, “Evaluación de bioaerosoles, bacterias y hongos, en el laboratorio de microbiología-biotecnología de la ESPE y construcción previa de un muestreador de burbujeo experimental”. (en línea). (Tesis) (Ingeniero de Biotecnología). (2012). Escuela Politecnica del Ejercito. Quito. pp. 18-19. [Consultado: 2015 -03 -12]. Disponible en:  
<http://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/5996>
39. **LÓPEZ, Geta.**, et. al., “Procedimiento de Muestreo”. *Guía Operativa para la recogida, almacenamiento y transporte de muestras de aguas subterráneas destinadas al análisis químico y bacteriológico*, España. 1997. pp. 9-22. [2014 -11 -17].  
<http://www.igme.es/actividadesIGME/lineas/HidroyCA/publica/libro30/lib30.htm>
40. **MAC CONKEY AGAR.** Laboratorios Britania. (en línea). 2010. [Consultado: 2015-04-12]. Disponible en:  
[http://www.britanialab.com/productos/302\\_hoja\\_tecnica\\_es.pdf](http://www.britanialab.com/productos/302_hoja_tecnica_es.pdf)

41. **MARAKI**, Sofía., et. all., “Surgical Wound Infection Caused by *Rahnella aquatilis*”. *Journal of clinical microbiology*. (en línea). (1994). N° 11. Vol. 32. Grecia. pp. 2706-2708. [Consulta: 2015 -04 -12]. Disponible en:  
<http://jcm.asm.org/content/32/11/2706.full.pdf>
42. **MARÍN**, Rafael., Análisis Físicoquímico y Microbiológico. *Físicoquímica y Microbiología de los medios acuáticos*. (en línea). (2003). España. Díaz de Santos S.A. pp. 277- 302. [Consulta: 2014 -12 -15]. Disponible en:  
[https://books.google.com.ec/books?id=k8bIixwJzYUC&pg=PR5&hl=es&source=gbs\\_selected\\_pages&cad=2#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.ec/books?id=k8bIixwJzYUC&pg=PR5&hl=es&source=gbs_selected_pages&cad=2#v=onepage&q&f=false)
43. **MÁRQUEZ**, Francisco., “Aislamiento y Taxonomía de Bacterias del Género *Bacillus* recolectadas en los suelos del bosque de *Pinus radiata* y una pradera permanente en distintas épocas de muestreo”. (en línea). (Tesis) (Licenciado en Ciencias Biológicas). (2007). Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias. Escuela de Ciencias. Chile. pp. 4-5. [ Consultado: 2015 -04 -12]. Disponible en:  
<http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2007/fcm357a/doc/fcm357a.pdf>
44. **MARTÍNEZ**, Jesús., Los beneficios de las aguas minerales naturales según su composición. *Informe científico del Instituto de Investigación Agua y Salud*. (en línea). N° 3. Madrid. Universidad Complutense de Madrid. pp.7-17. [ Consultado: 2014 -11 -12]. Disponible en:  
[www.aneabe.com/uploads/documentos/593973e112ce783b8172aa8b2e9f55eb.pdf](http://www.aneabe.com/uploads/documentos/593973e112ce783b8172aa8b2e9f55eb.pdf)
45. **Microgen TM GN-ID Identificación**. Camberley. (en línea). 2004. [Consultado: 2014-10-13]. Disponible en:  
<http://www.medica-tec.com/chi/files/MICROGEN-GN-ID-MID64-641-65.pdf>
46. **Microgen TM GnA+B-ID System**. Camberley. (en línea). 2004. [Consultado: 2014-10-13]. Disponible en:  
<http://www.medica-tec.com/arg/files/MICROGEN-GN-ID-MID65%20y%20MID641.pdf>
47. **MOSSO**, María., **DE LA ROSA**, María.; “Microbiología del agua mineromedicinal de los balnearios de Alhama de Granada”. *Real Academia Nacional de Farmacia*. (en línea). (2002). N° 28040 Vol. 68. Madrid. pp. 49-71. [ Consultado: 2015 -04 -12]. Disponible en:

<http://europa.sim.ucm.es/compludoc/AA?articuloId=183089>

48. **MOSSO**, María., et. al.; “Microbiología de los manantiales mineromedicinales del balneario Cervantes”. *Real Academia Nacional de Farmacia*. (en línea). (2006). Vol 72. Madrid. pp. 287-302. [Consultado: 2015 -03 -19]. Disponible en:  
<http://anales.ranf.com/ranf/index.php/aguas/article/view/329/348#page=59>
49. **MOSSO**, María., et. al.; “Microbiología de los manantiales mineromedicinales del balneario de Valdelateja”. *Real Academia Nacional de Farmacia*. (en línea). (2008). Vol 74. Madrid. pp. 508- 520. [ Consultado: 2015 -04 -12]. Disponible en:  
<http://www.analesranf.com/index.php/aguas/article/download/330/349#page=55>
50. **Petrifilm 3M**, Guía de Interpretación Recuento Aerobios. (en línea). 2003. [Consultado: 2014 -10 -23]. Disponible en:  
[http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat/workshopmrama/files/Petrifilm\\_guias.pdf](http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat/workshopmrama/files/Petrifilm_guias.pdf)
51. **Petrifilm 3M**, Guía de Interpretación Recuento de Coliformes Totales. (en línea). 2003. [ Consultado: 2014 -10 -23]. Disponible en:  
[http://solutions.productos3m.es/3MContentRetrievalAPI/BlobServlet?locale=en\\_WW&lmd=1307530120000&assetId=1273685360597&assetType=MMM\\_Image&blobAttribute=ImageFile](http://solutions.productos3m.es/3MContentRetrievalAPI/BlobServlet?locale=en_WW&lmd=1307530120000&assetId=1273685360597&assetType=MMM_Image&blobAttribute=ImageFile)
52. **Petrifilm 3M**, Guía de Interpretación Recuento de *Staphylococcus*. (en línea). 2003. [Consultado: 2014 -10 -23]. Disponible en:  
[http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat/workshopmrama/files/Petrifilm\\_guias.pdf](http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat/workshopmrama/files/Petrifilm_guias.pdf)
53. **Petrifilm 3M**, Guía de Interpretación Recuento de Hongos y Levaduras. (en línea). 2003. [ Consultado: 2014 -10 -23]. Disponible en:  
<http://industria.equitecsal.com/wp-content/plugins/download-monitor/download.php?id=6>
54. **SALMONELLA-SHIGELLA.**, Laboratorios Britania. (en línea). 2010. [Consultado: 2014-10-24]. Disponible en:  
[http://www.britanialab.com/productos/337\\_hoja\\_tecnica\\_es.pdf](http://www.britanialab.com/productos/337_hoja_tecnica_es.pdf)

55. **SAMTAMBROSIO**, Eduardo., *Tinción Gram y Observación de microorganismos*. (en línea). (2009). Universidad Tecnológica Nacional. Facultad Regional Rosario. Departamento de Ingeniería Química. Buenos Aires. pp. 2-5. [Consultado: 2014 -10 -23]. Disponible en:  
[http://www.frro.utn.edu.ar/repositorio/catedras/quimica/5\\_ano/biotecnologia/practico4.pdf](http://www.frro.utn.edu.ar/repositorio/catedras/quimica/5_ano/biotecnologia/practico4.pdf)
56. **SUÁREZ**, Margaret., **FAGUNDO**, Juan.; “Propiedades terapéuticas del agua mineromedicinal”. *Papel del agua mineral en el organismo y características terapéuticas de las aguas minerales*. (en línea). (1994). España. Complutense. pp. 2-8. [Consultado: 2014 -11 -12]. Disponible en:  
[http://www.sld.cu/sitios/mednat/docs/aguas\\_minerales.pdf](http://www.sld.cu/sitios/mednat/docs/aguas_minerales.pdf)
57. **SUIZA**., “Guías para la calidad de agua”. *Organización Mundial de la Salud*. (en línea). (2006). Vol. 1. 3.ed., Suiza. p. 32. [Consultado: 2014 -10 -23]. Disponible en:  
[http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/gdwq3rev/es/](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3rev/es/)
58. **TORTORA**, Gerard., **FUNKE**, Berdell., **CASE**, Christine.; “Tipos de microorganismos”. *Introducción a la Microbiología*. 9. ed. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana. (2007). pp. 4-6,19.
59. **VADEMECUM DE AGUAS MINEROMEDICINALES ESPAÑOLAS**., Instituto de salud San Carlos. (en línea). Madrid. Impresa. pp. 11-286. [Consultado: 2015 -11 -17]. Disponible en:  
[http://pendientedemigracion.ucm.es/info/hidromed/fileadmin/user\\_upload/descargas/Vademecum-espanol.pdf](http://pendientedemigracion.ucm.es/info/hidromed/fileadmin/user_upload/descargas/Vademecum-espanol.pdf)
- VILLAMIL**, Iago., et. al.; “Bacteriemia y neumonía por *Alcaligenes xylosoxidans* en un paciente inmunocompetente”. *Revista Chilena Infectol*. (en línea). (2013). Vol. 30. Chile. pp. 329. [Consultado: 2015 -04 -12]. Disponible en:  
[www.scielo.cl/pdf/rci/v30n3/art11.pdf](http://www.scielo.cl/pdf/rci/v30n3/art11.pdf)

## ANEXOS

### ANEXO A. Toma de muestra del agua de las termas de “Guapante”.



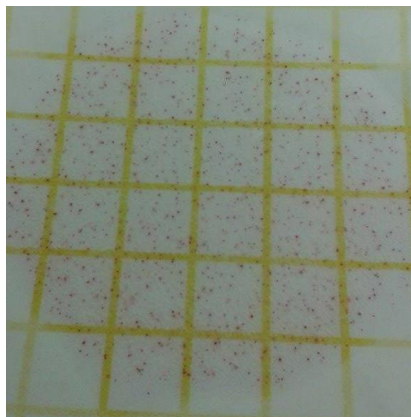
Punto de emergencia



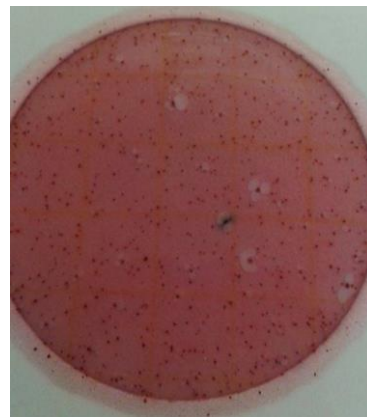
Piscina

**Realizado por:** Viviana M. Cruz C.

### ANEXO B. Recuento de Bacterias en el Petrifilm del punto de emergencia.

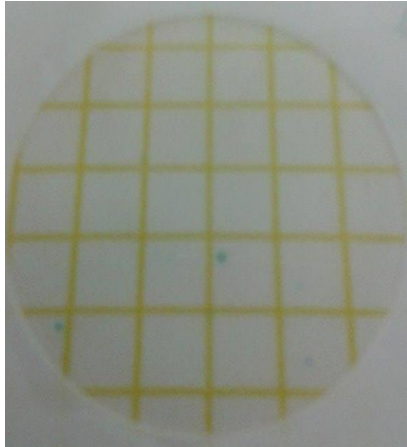


Colonias de Bacterias Aerobias Mesofilas  
Heterotrofas.

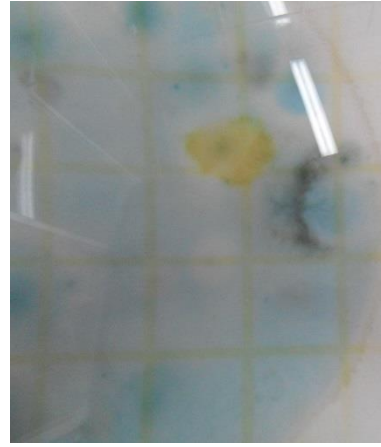


Colonias de Bacterias Coliformes Totales  
(rosadas) y Coliformes Fecales (rosadas con  
gas).





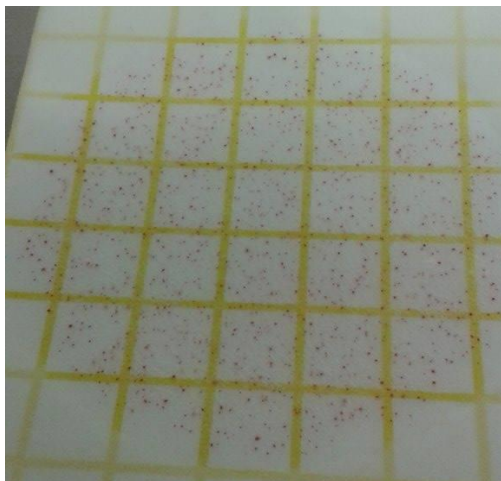
Colonias de Estafilococos (violeta), no  
Estafilococos (azul).



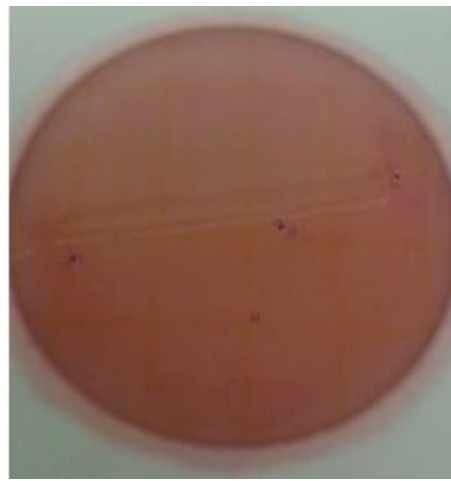
Colonias de Hongos y Levaduras.

**Realizado por:** Viviana M. Cruz C.

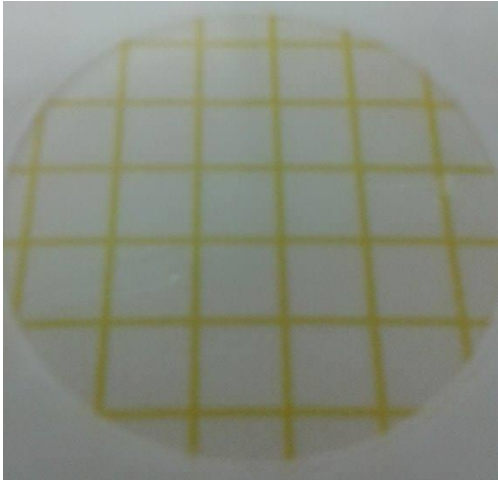
**ANEXO C. Recuento de Bacterias en Petrifilm de la Piscina.**



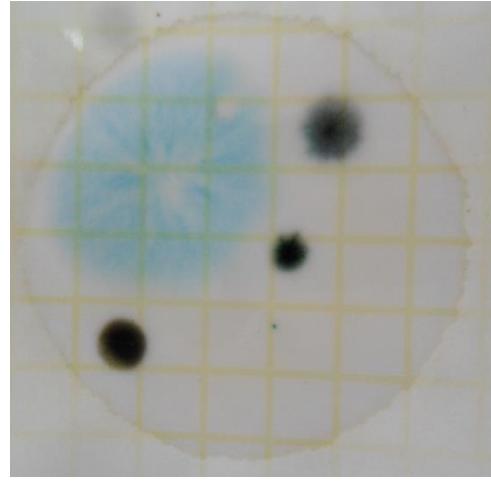
Colonias de Bacterias Aerobias Mesófilas  
Heterótrofas



Colonias de Coliformes Totales



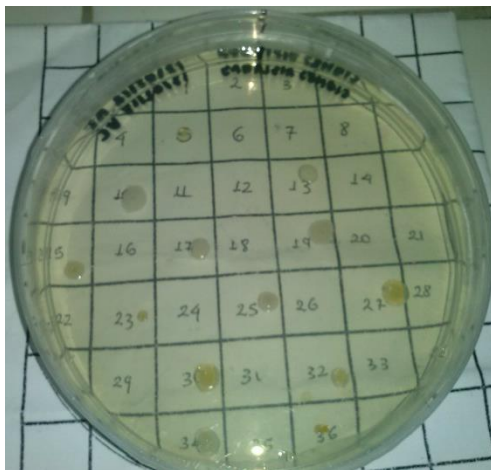
Colonias de Estafilococos



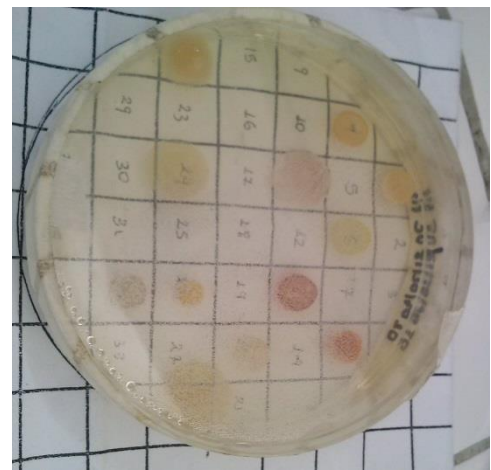
Colonias De Hongos y Levaduras

Realizado por: Viviana M. Cruz C.

**ANEXO D. Aislamiento de la colonia y sus repeticiones.**



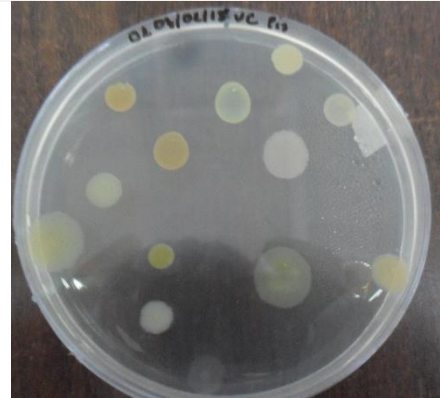
Primer repique ( Punto de emergencia)



Primer repique (Piscina)



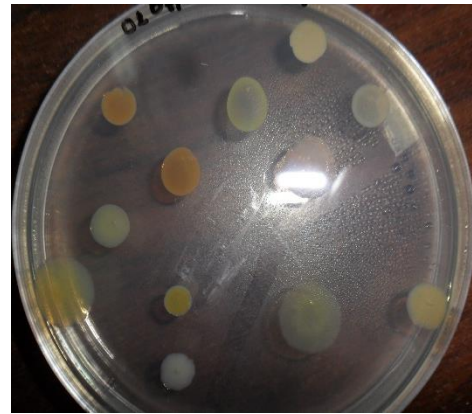
Segundo repique ( Punto de emergencia)



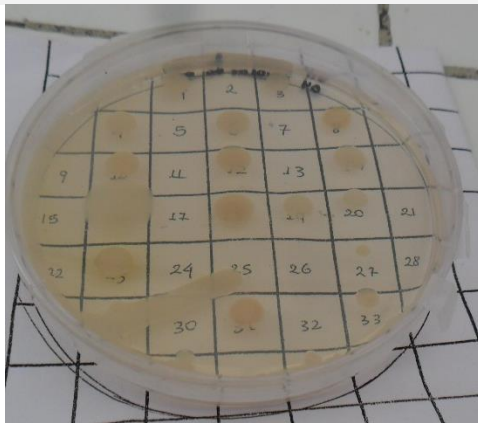
Segundo repique (Piscina)



Tercer repique (Punto de emergencia)



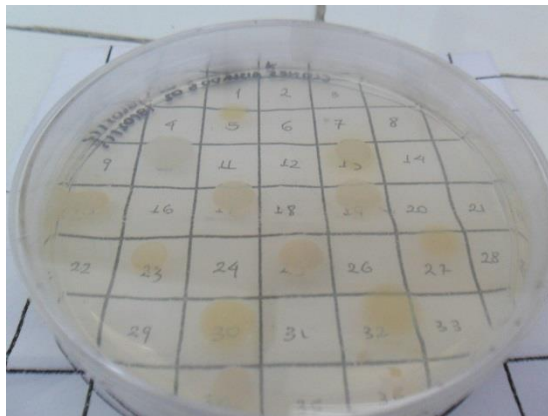
Tercer repique (Piscina)



Cuarto repique (Punto de emergencia)



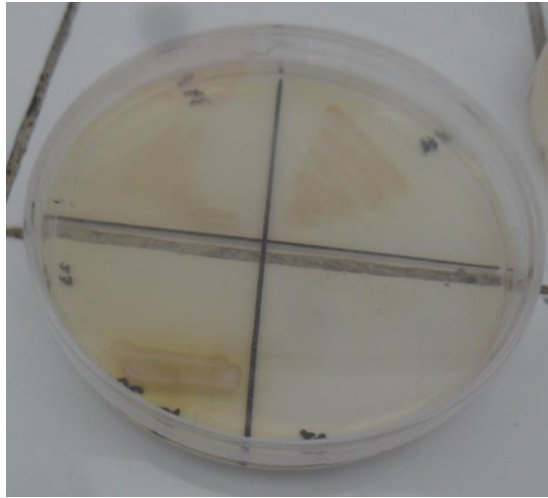
Cuarto repique (Piscina)



Colonias Aisladas del punto de emergencia y piscina

Realizado por: Viviana M. Cruz C.

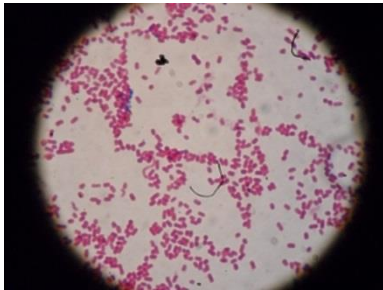
## ANEXO E. Siembra por Agotamiento



Obtención de colonias puras por siembra por agotamiento

**Realizado por:** Viviana M. Cruz C.

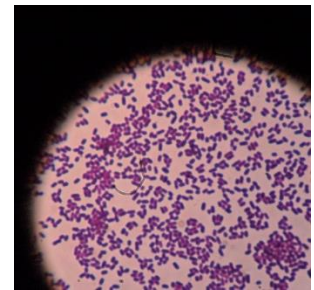
## ANEXO F. Tinción Gram de las colonias



Bacilos Gram Negativos



Bacilos Gram Positivos

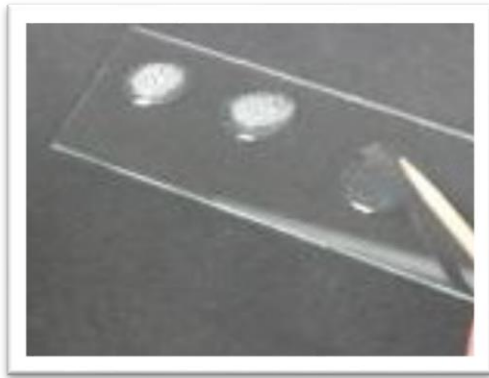


Cocos Gram Positivos

**Realizado por:** Viviana M. Cruz C.



### ANEXO G. Prueba de Oxidasa y de la Catalasa



Prueba de la Catalasa: Presencia de burbujas (Positivo).

Prueba de la Oxidasa: Color Azul (Positivo)

**Realizado por:** Viviana M. Cruz C.

### ANEXO H. Prueba de Fermentación y Movilidad



Fermentativas (color amarillo) e Inertes (color azul)



Fermentativas (color amarillo) e Inertes (color azul)



Movilidad Positiva (color oscuro)

**Realizado por:** Viviana M. Cruz C.

**ANEXO I. Siembra en agar Almidón y Gelatina.**



*Bacillus subtilis*: Agar Almidón (Positivo)



*Bacillus subtilis* Agar Gelatina (Positivo)

Realizado por: Viviana M. Cruz C.

**ANEXO J. Pruebas Bioquímicas para bacterias Oxidasa negativa.**



*Escherichia coli*: Kligler (Glucosa y Lactosa, Positiva) y Gas (Positivo); SIM (Positivo) e Indol (Positivo); Urea (Negativa) y Citrato (Positivo).



*Enterobacter cloacae*: Kligler (Glucosa y Lactosa, Positiva) y Gas (Positivo); SIM (Positivo) e Indol (Negativo); Urea (Variable) y Citrato (Positivo).



*Citrobacter amalonaticus*: Kligler (Glucosa y Lactosa, Positiva) y Gas (Positivo); SIM (Positivo) e Indol (Positivo); Urea (Positiva) y Citrato (Positivo).



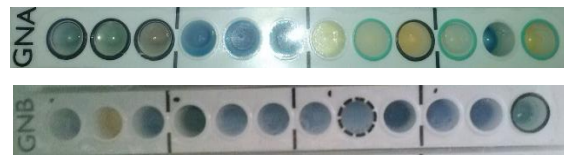
*Rahnella aquatilis*: Kligler (Glucosa y Lactosa, Positiva) y H<sub>2</sub>S (Positivo); SIM (Positivo) Indol (Negativo) y H<sub>2</sub>S (Positivo); Urea (Positiva) y Citrato (Positivo).

**Realizado por:** Viviana M. Cruz C.

#### ANEXO I. Pruebas Bioquímicas para bacterias Oxidasa positiva.



*Alcaligenes faecalis*: Kligler (Glucosa y Lactosa, Negativa) y Gas (Negativo); SIM (Negativo) e Indol (Negativo); Citrato (Positivo) y Urea (Negativa).



*Alcaligenes faecalis*: Galería API  
 GNA: Lisina, Ornitina, H<sub>2</sub>S, Glucosa, Manitol, Xilosa, ONPG, Indol, Ureasa, VP, Citrato ( ) y TDA.  
 GNB: Gelatina, Malonato, Inositol, Sorbitol, Ramnosa, Sucrosa, Lactosa, Arabinosa, Adonitol, Rafinosa, Salicina y Arginina.

**Realizado por:** Viviana M. Cruz C.