



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“ESTUDIO MICROBIOLÓGICO DE LOS MANANTIALES
TERMALES DEL BALNEARIO “URAUCO” UBICADO EN LA
PARROQUIA LLOA PERTENECIENTE A LA PROVINCIA DE
PICHINCHA”**

Trabajo de titulación presentado para optar el grado académico de:

BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

Autor:

ROLANDO LEONIDAS GUAILLA YUNGÁN

Riobamba – Ecuador

2015



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

“ESTUDIO MICROBIOLÓGICO DE LOS MANANTIALES TERMALES DEL BALNEARIO “URAUCO” UBICADO EN LA PARROQUIA LLOA PERTENECIENTE A LA PROVINCIA DE PICHINCHA”

Trabajo de titulación presentado para optar el grado académico de:

BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

Autor: ROLANDO LEONIDAS GUAILLA YUNGÁN

Tutor: Dr. GERARDO EMILIO MEDINA RAMÍREZ

Riobamba – Ecuador

2015

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El tribunal del Trabajo de Titulación certifica que: El trabajo de investigación: “**ESTUDIO MICROBIOLÓGICO DE LOS MANANTIALES TERMALES DEL BALNEARIO “URAUCO” UBICADO EN LA PARROQUIA LLOA PERTENECIENTE A LA PROVINCIA DE PICHINCHA**”, de responsabilidad del señor Rolando Leonidas Guaila Yungán, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Titulación, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Dr. Gerardo Medina
DIRECTOR DEL TRABAJO
DE TITULACIÓN

Dr. Félix Andueza
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

DOCUMENTALISTA
SISBIB ESPOCH

NOTA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Rolando Leonidas Guaila Yungán, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en este Trabajo de Titulación; y el patrimonio intelectual del Trabajo de Titulación, pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

ROLANDO LEONIDAS GUAILLA YUNGÁN

DEDICATORIA

A Dios, por estar conmigo en cada paso que doy y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

A mis padres María y Domingo, por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante y siempre creer en mí.

A mis hermanas Marcia y Aída, por ser el ejemplo a seguir, por estar conmigo y apoyarme siempre, las quiero mucho.

Rolando

AGRADECIMIENTO

Primero y antes que nada, agradezco a Dios ser maravilloso que me dio fuerza y fe, por iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

En especial deseo expresar todo mi agradecimiento a mis padres, hermanas y demás familiares, que siempre estuvieron conmigo de forma incondicional a lo largo de este trayecto.

Quiero expresar también mi agradecimiento a la ciudad de Riobamba, mi segundo hogar y especialmente a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por abrirme sus puertas y permitir mi formación académica.

De igual manera mi más sincero agradecimiento al Dr. Gerardo Medina y Dr. Félix Andueza por el apoyo, orientación y experiencia que me brindaron día con día para culminar esta investigación.

En general, a todos los docentes de la escuela de Bioquímica y Farmacia, así como al personal del Laboratorio de Análisis Bioquímicos y Bacteriológicos conformado por la Dra. Aida, Dra. Patricia y Dra. Chavelita, y de manera especial a los administradores del Balneario de Aguas Termales Urauco ubicado en Lloa.

Rolando

TABLA DE CONTENIDO

CONTENIDO	Páginas
RESUMEN	xv
SUMMARY	xvi
INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO I	
1. MARCO TEÓRICO.....	3
1.1 El agua.....	3
1.2 Aguas Termales.....	3
<i>1.2.1 Origen de las aguas termales.....</i>	<i>4</i>
<i>1.2.2 Clasificación de las aguas termales</i>	<i>4</i>
<i>1.2.2.1 Por su temperatura.....</i>	<i>4</i>
<i>1.2.2.2 Por su composición química.....</i>	<i>5</i>
<i>1.2.2.2.1 Con relación a los iones</i>	<i>5</i>
<i>1.2.2.2.2 Con relación a los cationes</i>	<i>5</i>
<i>1.2.2.3 Por su salinidad.....</i>	<i>5</i>
<i>1.2.3 Propiedades curativas de las aguas termales</i>	<i>6</i>
1.3 Parámetros Físico-químicos del agua	8
<i>1.3.1 Temperatura.....</i>	<i>8</i>
<i>1.3.2 pH.....</i>	<i>8</i>
<i>1.3.3 Conductividad</i>	<i>8</i>
<i>1.3.4 Solidos totales disueltos (STD)</i>	<i>8</i>
<i>1.3.5 Color.....</i>	<i>8</i>
<i>1.3.6 Olor.....</i>	<i>9</i>
1.4 Los microorganismos	9
<i>1.4.1 Características microbiológicas de las aguas termales</i>	<i>10</i>
<i>1.4.1.1 Microorganismos autóctonos</i>	<i>10</i>

1.4.1.1.1	<i>Microorganismos autóctonos según la composición mineral del agua</i>	11
1.4.1.1.2	<i>Microorganismos autóctonos según temperatura del agua</i>	11
1.4.1.1.3	<i>Microorganismos autóctonos según los nutrientes del agua</i>	12
1.4.1.2	<i>Microorganismos alóctonos</i>	13
1.4.1.2.1	<i>Importancia de los microorganismos alóctonos</i>	13
1.4.1.3	<i>Microorganismos alóctonos usados como indicadores sanitarios</i>	13
1.4.1.3.1	<i>Coliformes totales</i>	14
1.4.1.3.2	<i>Escherichia coli</i>	14
1.4.1.4	<i>Otros microorganismos</i>	15
1.4.1.4.1	<i>Hongos</i>	15
1.4.1.4.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	15
1.5	Recuento e identificación de microorganismos	16
1.5.1	Placas Petrifilm	16
1.5.2	Sistemas de identificación	16
1.5.2.1	<i>Sistemas de identificación tradicionales</i>	16
1.5.2.1.1	<i>Pruebas Bioquímicas</i>	17
1.5.2.2	<i>Sistemas de identificación comerciales manuales o galerías multipruebas</i>	18
1.5.2.2.1	<i>El sistema de identificación Microgen™ GN-ID</i>	18
1.6	Resistencia a antibióticos en bacterias del agua	18
1.6.1	Métalo β-lactamasas (grupo B)	19
1.7	Actividad antibacteriana de los microorganismos del agua	20
CAPÍTULO II		
2.	PARTE EXPERIMENTAL	22
2.1	Lugar de la investigación	22
2.2	Factores de estudio	24
2.3	Materiales, equipos, reactivos y medios de cultivo	24
2.3.1	<i>Materiales</i>	24
2.3.2	<i>Equipos</i>	24
2.3.3	<i>Medios de cultivo</i>	25

2.3.4	Reactivos	25
2.4	Métodos y técnicas	25
2.4.1	Toma de muestras	25
2.4.2	Análisis microbiológico	26
2.4.2.1	<i>Recuento de: aerobias mesófilas, Escherichia coli, coliformes totales, Staphylococcus áureus, mohos y levaduras. (Método Placas 3M™ Petrifilm™).</i>	26
2.4.2.1.1	<i>Técnica de Petrifilm™ según 3M™, 2009</i>	26
2.4.2.2	<i>Selección y estabilización de las colonias bacterianas</i>	27
2.4.2.3	<i>Obtención de cepas puras, mediante siembra por agotamiento</i>	28
2.4.2.4	<i>Descripción morfológica macroscópica de las colonias bacterianas</i>	29
2.4.2.5	<i>Tinción Gram de los clones individuales obtenidos por agotamiento</i>	29
2.4.2.6	<i>Identificación de las colonias bacterianas puras</i>	30
2.4.2.6.1	<i>Pruebas bioquímicas</i>	30
2.4.2.6.2	<i>Pruebas Microgen™ GN-ID Identificación</i>	33
2.4.2.7	<i>Determinación de la susceptibilidad a diversos antibióticos</i>	35
2.4.2.8	<i>Detección de metalo β-lactamasas (grupo B)</i>	36
2.4.2.9	<i>Determinación de la actividad antimicrobiana de las cepas aisladas</i>	37
CAPÍTULO III		
3.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	39
3.1	Parámetros fisicoquímicas y características generales de las aguas termales del balneario Urauco	39
3.2	Análisis microbiológico de las aguas termales del balneario Urauco	41
3.2.1	<i>Bacterias Aerobias Mesófilas</i>	41
3.2.2	<i>E. coli/Coliformes</i>	42
3.2.3	<i>Staphylococcus aureus</i>	45
3.2.4	<i>Mohos y levaduras</i>	46
3.2.5	<i>Resumen del recuento de microorganismos indicadores analizados en el balneario de aguas termales Urauco</i>	47

3.2.6	<i>Caracterización microscópica de las colonias aisladas en las aguas termales del balneario Urauco</i>	49
3.2.7	<i>Morfología y tinción Gram de los clones puros aislados a partir de las aguas termales del balneario Urauco</i>	52
3.2.8	<i>Identificación de Géneros y especies de las bacterias aisladas en las aguas termales del balneario Urauco</i>	57
3.3	Determinación de la actividad antibacteriana de los clones aislados en el balneario de aguas termales Urauco	65
3.4	Perfil de susceptibilidad de los clones aislados del balneario de aguas termales Urauco frente a diversos antibióticos.	67
3.4.1	<i>Detección de metalo β-lactamasas (grupo B)</i>	73
	CONCLUSIONES	74
	RECOMENDACIONES	75
	BIBLIOGRAFÍA	
	ANEXOS	

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

A/A	ácido/ácido (amarillo/amarillo)
Alc/A	alcalino/ ácido (rojo/amarillo)
Alc/Alc	alcalino/alcalino (rojo/rojo)
Alc/NC	alcalino/sin cambios (rojo/naranja rojizo)
AOAC	AOAC Internacional (Asociación de Químicos Analíticos Oficiales)
ATCC	American Type Culture Collection
CE	Conductividad eléctrica
°C	Grados Celsius
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
F	Fermentativo
INAMHI	Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología
KIA	Agar para tubos con hierro de Kligler (Kligler's Iron Agar)
mL	Mililitros
mm	Milímetros
O	Oxidativo, oxidación
ONPG	orto-nitrofenilgalactopiranosido
ppm	Partes por millón
pH	Potencial de hidrógeno
R	Resistente (Resist)
S	Sensible (Sens)
SIM	Sulfuro-indol-motilidad
STD	Sólidos totales disueltos
TDA	Triptófano deaminasa
UFC	Unidades formadoras de colonias
VP	Voges Proskauer
%	Porcentaje

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-3.	Parámetros físico-químicos y características generales de las aguas termales del balneario Urauco.....	39
Tabla 2-3.	Número de bacterias aerobias mesófilas (UFC/mL)	41
Tabla 3-3.	Número de bacterias <i>E. coli</i> /Coliformes (UFC/mL)	43
Tabla 4-3.	Número de bacterias <i>S. aureus</i> (UFC/mL).....	45
Tabla 5-3.	Número de mohos y levaduras (UFC/mL).....	46
Tabla 6-3.	Resumen del recuento de microorganismos (UFC/mL) en las aguas termales del balneario Urauco, Lloa.....	48
Tabla 7-3.	Identificación y caracterización microscópica de los clones aislados del manantial	50
Tabla 8-3.	Identificación y caracterización microscópica de los clones aislados de la piscina	51
Tabla 9-3.	Morfología y tinción Gram de los clones puros	53
Tabla 10-3.	Características morfológicas de las clones puros	56
Tabla 11-3.	Pruebas bioquímicas y microorganismos identificados en el balneario de aguas termales Urauco.....	58
Tabla 12-3.	Resultados del sistema “Microgen GNA + B Oxidasa positivo” para los clones 4,10 y 26 aislados del manantial	59
Tabla 13-3.	Distribución porcentual de microorganismos identificados en las aguas termal del balneario Urauco	60
Tabla 14-3.	Actividad antibacteriana de los clones aislados del balneario de aguas termales del de Urauco.....	65
Tabla 15-3.	Susceptibilidad a diversos antibióticos de las bacterias Gram negativas aisladas en las aguas termales del balneario Urauco.....	67
Tabla 16-3.	Porcentaje de susceptibilidad y resistencia de bacterias Gram negativas frente a diversos antibióticos.....	68

Tabla 17-3.	Susceptibilidad a diversos antibióticos del género <i>Bacillus</i> (Gram positivo) aislado en la piscina del balneario de Urauco	69
Tabla 18-3.	Evaluación fenotípica de la producción de metalo β -lactamasas en las bacterias aisladas en el balneario de aguas termales Urauco	73

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1-1.	Indicaciones terapéuticas de las aguas mineromedicinales en base a su composición mineral.	7
Cuadro 2-1.	Usos de las principales pruebas bioquímicas utilizadas en microbiología....	17

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-3.	Bacterias aerobias mesófilas	41
Gráfico 2-3.	<i>E. coli</i> /Coliformes totales.....	43
Gráfico 3-3.	Mohos y levaduras	46
Gráfico 4-3.	Microorganismos encontrados en las aguas termales de balneario Urauco.....	48
Gráfico 5-3.	Diversidad de tipos morfológicos (% cepas).....	54
Gráfico 6-3.	Porcentaje de microorganismo en el balneario Urauco.....	60
Gráfico 7-3.	Porcentaje de susceptibilidad y resistencia de bacterias Gram negativas frente a distintos antibióticos	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1.	Origen de las aguas termominerales	4
Figura 2-1.	(A) Morfología de las bacterias según la tinción Gram. (B) Morfología de las bacterias.....	10
Figura 3-1.	Microorganismos resistentes a antibióticos	19
Figura 4-2.	Ubicación del balneario de aguas termales Urauco, Lloa	22
Figura 5-2.	Siembra por agotamiento	29
Figura 6-2.	Fenotipo de producción de metalo β -lactamasas	37

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía 1-2.	Manantial natural.....	23
Fotografía 2-2.	Punto surgencia del agua en la piscina.....	23

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A	Puntos de muestreo
Anexo B	Siembra en placas Petrifilm
Anexo C	Recuento de Aerobios mesófilos
Anexo D	Recuento de <i>E. coli</i> /coliformes
Anexo E	Recuento de Staph Express (<i>Staphylococcus aureus</i>)
Anexo F	Recuento de Levaduras y Mohos
Anexo G	Aislamiento de colonias
Anexo H	Clones puros
Anexo I	Pruebas bioquímicas generales de identificación
Anexo J	Pruebas bioquímicas generales-específicas de identificación
Anexo K	Sistema de identificación Microgen GNA + B Oxidasa positivo
Anexo L	Pruebas bioquímicas para bacilos Gram positivos
Anexo M	Detección de metalo β -lactamasas
Anexo N	Susceptibilidad a antibióticos
Anexo O	Actividad antibacteriana
Anexo P	Ficha de clasificación del manantial natural del balneario Urauco según el INAMHI
Anexo Q	Ficha de clasificación de la piscina del balneario Urauco según el INAMHI

RESUMEN

En la presente investigación se muestra un estudio microbiológico de las aguas termales del Balneario Urauco en la parroquia Lloa, perteneciente a la ciudad de Quito, la finalidad fue conocer la microbiota de estas aguas en forma cuantitativa y cualitativa, para lo cual se determinaron los indicadores de calidad sanitaria, se identificó taxonómicamente las bacterias abordando aspectos relacionados a la susceptibilidad a antibióticos y la actividad antibacteriana presente en los microorganismos aislados. La estimación de los indicadores de calidad sanitaria se llevó a cabo mediante el método de recuento en placas Petrifilm y la identificación taxonómica se realizó principalmente por pruebas bioquímicas, la susceptibilidad a antibióticos se realizó por el método de Kirby-Bauer, y en la evaluación de la actividad antibacteriana se utilizaron como cepas monitor a *P. aeruginosa* ATCC27853 y *S. aureus* ATCC25923. Luego de analizar los 2 puntos muestreados el número de microorganismos en UFC/mL en el manantial fue: 7.3×10^2 (aerobios mesófilos), 10 (coliformes T), 3 (*E. coli*), 1 (moho) y 6 (levaduras); en la piscina: 3.3×10^2 (aerobios mesófilos), 93 (coliformes T), 1 (*E. coli*) y 63 (levaduras). A su vez, los géneros identificados fueron: *Acidovorax*, *Aeromonas*, *Pasteurella*, *Citrobacter*, *Brevundimonas*, *Flavobacterium*, *Vibrio*, *Budvicia* y *Bacillus*. Se evidencio que *A. salmonicidas subsp. salmonicida*, *P. multocida*, *C. freundii* y *A. caviae* poseen multirresistencia a los antibióticos: ampicilina, amoxicilina/ác. Clavulánico y cefalotina, mientras que *Bacillus spp* fue multirresistente a ampicilina, penicilina y oxacilina. Además se encontró que *F. odoratum* fue sensible a todos los antibióticos evaluados. Finalmente, *B. aquatica* presentó actividad antibacteriana frente a *S. aureus* ATCC25923. En conclusión se encontró gran diversidad y una cantidad considerable de micoorganismos, que no son perjudiciales para la salud de los bañistas. Se recomienda a las autoridades pertinentes la implementación de una normativa que regule la calidad sanitaria de las aguas termales en el Ecuador.

PALABRAS CLAVE: <MICROBIOLOGÍA> <BALNEARIO URAUCO> <AGUAS TERMALES> <MICROORGANISMOS INDICADORES> <SUSCEPTIBILIDAD> <ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA> <ANTIBIÓTICOS>

SUMMARY

The present research is a hot spring microbiological study at Urauco Resort in the parish of Lloa, from Quito city, its purpose was to know the microbiota of these waters in a qualitative and quantitative way where the sanitary quality indicators were determined, It was identified taxonomically the bacteria considering aspects related to the antibiotic susceptibility and antibacterial activity presented in the isolated microorganisms. The estimations of sanitary quality indicators were carried out through Petrifilm plate method and the taxonomic identification was made by biochemical test, the antibiotic susceptibility was carried out by the Kirby–Bauer method, and in the evaluation of the antibacterial activity was used as monitor strains to *P. aeruginosa* ATCC27853 and *S. aureus* ATCC25923. After analyzing the 2 sampled points the number of microorganisms in CFU/mL at hot spring was 7.3×10^2 (mesophilic aerobic), 10 (T coliforms), 3 (*E. coli*), 1 (mould) and 6 (Yeasts); in the pool: 3.3×10^2 (mesophilic aerobic), 93 (T coliforms), 1 (*E. coli*) and 63 (Yeasts). At the same time, the genders identified were: *Acidovorax*, *Aeromonas*, *Pasteurella*, *Citrobacter*, *Brevundimonas*, *Flavobacterium*, *Vibrio*, *Budvicia* and *Bacillus*. It was evidenced that *A. salmonicidas subsp. salmonicida*, *P. multocida*, *C. freundii* and *A. caviae* possess multi-resistant to antibiotic: ampicillin, amoxicillin/ac. Clavulanic and cefalotin, while *Bacillus spp* was multi-resistant to the ampicillin, penicillin and oxacillin. Moreover it is found that *F. odoratum* was sensible to all antibiotics evaluated. Finally, *B. aquatic* presented antibacterial activity against *S. aureus* ATCC25923. In conclusion it was found great diversity and considerable amount of microorganisms which are not harmful to health of bathers. It is recommended to the relevant authorities implement a regulation to control the sanitary quality from hot spring in Ecuador.

KEY WORDS: <MICROBIOLOGY> <URAUCO RESORT> <HOT SPRING>
<MICROORGANISMS INDICATORS> <SUSCEPTIBILITY> <ANTIBACTERIAL
ACTIVITY> <ANTIBIOTIC>

INTRODUCCIÓN

Los manantiales termales son hábitats extremos debido a sus altas temperaturas y elevadas concentraciones iónicas, condiciones que no son favorables para el desarrollo microbiano. No obstante en la bibliografía se reporta que allí prolifera una microbiota autóctona característica de cada tipo de manantial que depende de factores como la temperatura, pH y composición mineral, sin embargo también se desarrolla una microbiota aloctona, que proviene del ambiente que rodea a los manantiales. (BORJA J et al., 2012. p. 66)

Las aguas termales se definen como aquellas que poseen una temperatura superior de 5°C sobre la temperatura del ambiente, característica importante que permite distinguirlas de los manantiales que no son termales, también se debe tomar en consideración que los manantiales termales pueden tener temperaturas de hasta 90°C en el momento de emerger. (BURBANO N et al., 2013. p 6)

Las aguas termales en la actualidad son fuentes de investigaciones microbiológicas, para conocer la diversidad microbiana debido a las características de los microorganismos de sobrevivir o adaptarse a estos hábitats.

La importancia de algunos microorganismos que sobreviven únicamente en las aguas termales, está basada en las aplicaciones de los metabolitos secundarios en distintas actividades biológicas y enzimáticas para la medicina, industria farmacéutica y biotecnológica. De la misma manera los microorganismos capaces adaptarse o colonizar las aguas termales, pueden tener efectos no deseables que pudieran suponer un riesgo para la salud de los usuarios. (BORJA J et al., 2012: p. 66)

El Ecuador al encontrarse en el círculo de fuego del pacífico posee numerosos manantiales termales, las principales fuentes se encuentran en ciudades como: Baños, Papallacta, Urcuquí (Chachimbiro), Baños de Cuenca, Santa Elena (San Vicente), Portovelo, Saraguro, Lloa (termas Urauco), etc. (ABORDO, 2013. p. 52)

Algunos historiadores sostienen la teoría de que los incas ecuatorianos Huayna Cápac y Atahualpa utilizaban las aguas termales para conservar y mejorar la salud, tradiciones que se mantienen hasta la actualidad ya que este tipo de agua se usa con fines recreacionales y en tratamientos hidroterapéuticos por vía tópica y en ocasiones por vía oral, aplicaciones que son sustentadas por conocimientos ancestrales y populares de la población. (BURBANO N et al., 2013. p. 6)

El estudio microbiológico de las aguas termales en el Ecuador es una temática poco estudiada, debido a esto actualmente se desconoce por completo la población microbiana que conforman las aguas termales, así como la probable presencia de microorganismos de interés sanitario.

Tomando en consideración lo señalado anteriormente el objetivo de esta investigación es conocer la diversidad microbiana, determinar la cantidad de microorganismos aerobios mesófilos, *Staphylococcus aureus*, coliformes totales, *Escherichia coli*, mohos y levaduras; así como identificar y evaluar la sensibilidad de las bacterias aisladas frente a distintos antibióticos, ya que los manantiales termales del Balneario Urauco perteneciente parroquia Lloa de la provincia de Pichincha, al igual que otros balnearios son usados por niños, ancianos y personas con problemas médicos.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1 El agua

El agua es una sustancia química compuesta de dos átomos de hidrógeno y uno de oxígeno, puede presentarse en cualquiera de los tres estados: líquido, gas (vapor) y sólido (hielo) (Sierra C, 2011, p. 53).

La cantidad total de agua sobre la tierra, se distribuye de la siguiente manera los océanos contienen la gran mayoría: 97.13%. Los casquetes polares y los glaciares contienen 2.24%; el agua subterránea un 0.61% y los ríos lagos y corrientes solo corresponden al 0.02% del total. (Snoeyink V y Jenkins D, 1990: p. 15)

1.2 Aguas Termales

Son aquellas aguas subterráneas que en el lugar donde emergen poseen una temperatura superior en 5°C a la temperatura media anual del ambiente. (BURBANO N et al., 2013. p. 6)

Diversas denominaciones son usadas para referirse a las aguas termales y relacionarlas con los minerales disueltos que poseen, así tenemos: aguas minerales, mineromedicinales y termominerales. (FLORES, Sandra. 2013. p. 5)

- Aguas termominerales: son aguas termales que contienen un total de sólidos disueltos superior a 1g/L. (FLORES, Sandra. 2013. p. 5)
- Aguas minerales: son aquellas que están libres de contaminación, y poseen por lo menos 1 gramo de sustancia mineral por cada litro de agua. (FLORES, Sandra. 2013. p. 5)
- Aguas mineromedicinales: son aquellas que en su composición contienen sales minerales disueltas o suspendidas con propiedades curativas. (LLOPIS, María del Mar. 2013. p. 161)

Las aguas termales son a su vez mineromedicinales, pero no todas las aguas mineromedicinales son termales. (LLOPIS, María del Mar. 2013. p. 161)

1.2.1 Origen de las aguas termales

Las aguas termales resultan de la infiltración de las aguas meteorológicas hasta cierta profundidad, en donde adquieren su temperatura por efecto del gradiente geotérmico quedando almacenada y formando una capa acuífera, de esta manera el calor propio de la zona profunda provoca un cambio de temperatura en el agua para luego emerger a la superficie como fuentes termales, en cambio otras surgen desde las profundidades cercanas a las regiones volcánicas es decir que no provienen de la superficie, se forman a grandes profundidades, altas temperaturas y elevada presión estas aguas emergen a la superficie ya sea violentamente en estado de vapor durante las erupciones volcánicas, o lentamente en forma de fuentes termales. (SAN MIGUEL DE LA CAMARA, Maximino. 1956. p. 14)

En ambos casos el agua adquiere su composición química al entrar en contacto con el suelo y las ROCAS. (BURBANO, Napoleón., et al. 2013. p. 7)

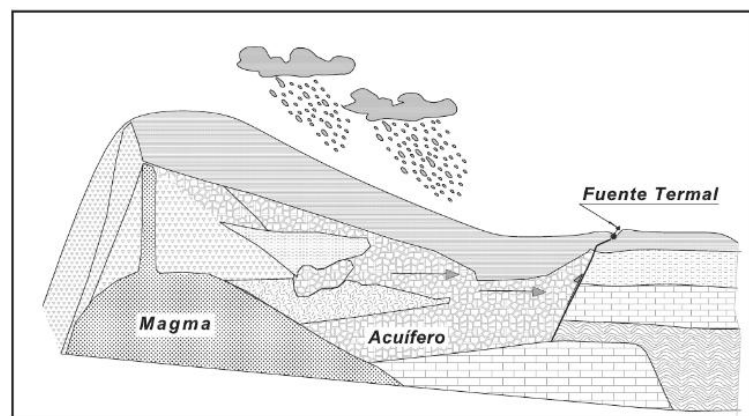


Figura 1-1. Origen de las aguas termominerales
Fuente: INAMHI, 2012

1.2.2 Clasificación de las aguas termales

Las aguas termales se clasifican principalmente en base a parámetros como: temperatura, composición química, cantidad de residuo seco, salinidad, etc.

1.2.2.1 Por su temperatura.

Las aguas termales se clasifican en:

- Frías: < de 20°C.
- Hipotermiales: entre 20 y 30°C
- Termales: entre 30 y 40°C

- Hipertermales: > de 40°C. (SCHOELLER, Herni. 1962. p. 120)

1.2.2.2 Por su composición química.

El método más utilizado para categorizar estas aguas es el de Kurlov, el cual toma como referencia los aniones y los cationes que exceden el 20% meq/l, es decir basándose en el contenido de los iones más abundantes.

1.2.2.2.1 Con relación a los iones

- Bicarbonatadas
- Sulfatadas
- Cloruradas
- Bicarbonatadas sulfatadas
- Bicarbonatadas cloruradas
- Sulfatadas cloruradas
- Sulfatadas cloruradas bicarbonatadas

1.2.2.2.2 Con relación a los cationes

- Cállicas
- Magnésicas
- Sódicas
- Cállicas magnésicas
- Cállicas sódicas
- Magnésicas sódicas
- Cállicas magnésicas sódicas. (FAGUNDO, J. 1996. p. 20)

1.2.2.3 Por su salinidad

La salinidad depende de la concentración de sales disueltas por lo que está relacionada con los sólidos disueltos totales (TDS).

- Baja salinidad (STD = 0 a 160mg/ml)
- Salinidad media (STD = 160 a 480mg/ml)
- Salinidad alta (STD = 480 a 1440mg/ml)

- Salinidad muy alta (STD = mayor a 1440mg/ml) (BURBANO, Napoleón., et al. 2013. p. 13)

1.2.3 Propiedades curativas de las aguas termales

La temperatura y las sales minerales son los factores del agua que intervienen para producir los efectos terapéuticos beneficiosos, debido a la interacción local entre el agua y la piel. (LAGARTO, Alicia., & BERNAL, Ingrid. 2002. p. 65)

Las personas reciben la acción directa de la temperatura y los minerales, estos comienzan a ser absorbidos en pequeñas concentraciones por la piel, se depositan en el tejido celular subcutáneo y desde ahí ejercen su acción terapéutica. (GEOSALUD. 2014)

La temperatura del agua termal modifica la dimensión de los vasos y la irrigación sanguínea provocando un estado de relajación mental, mejorando la actividad muscular, disminuyendo el dolor, otros beneficios incluyen la normalización de las funciones de las glándulas endocrinas, producción de endorfinas, etc. Las indicaciones terapéuticas varían, así como la forma de aplicación según se indican en el cuadro 1-1. (JIMÉNEZ, R. 2002. p. 249)

La exposición a un baño en aguas termales incrementa la temperatura corporal lo que permite disolver y eliminar las toxinas, se incrementa la presión hidrostática lo que provoca un aumento de la circulación sanguínea y la oxigenación. Enfermedades como psoriasis, dermatitis e infecciones por hongos, tienen una evidente mejoría por baños en aguas termales, en especial si el agua contiene azufre. (GEOSALUD. 2014)

Cuadro 1-1. Indicaciones terapéuticas de las aguas mineromedicinales en base a su composición mineral.

TIPOS DE AGUAS	INDICACIONES TERAPÉUTICAS	MODO DE APLICACIÓN
Cloruradas	<ul style="list-style-type: none"> • Afecciones traumáticas • Afecciones reumáticas • Afecciones ginecológicas • Rinitis y laringitis crónicas • Dispepsias, estreñimiento • Alteraciones hepatobiliares • Afecciones de la piel • Gota 	Baños, duchas, inhalaciones y bebida
Sulfatadas	<ul style="list-style-type: none"> • Colecistopatías y litiasis biliar • Afecciones de la piel • Rehabilitación • Afecciones reumáticas • Dispepsias, enteritis y estreñimiento • Gota y diatesis úrica • Oxalurias y fosfaturias 	Baños, duchas y bebida
Bicarbonatadas	<ul style="list-style-type: none"> • Afecciones gástricas • Dispepsias • Colecistopatías y litiasis biliar • Afecciones biliares y litiasis 	Bebida
Sulfuradas	<ul style="list-style-type: none"> • Afecciones de las vías respiratorias • Afecciones de la piel • Reumatismo • Rehabilitación • Afecciones hepáticas • Enteritis • Secuelas postraumáticas • Alteraciones metabólicas 	Baños, duchas, inhalaciones y bebida
Ferruginosas	<ul style="list-style-type: none"> • Anemias • Afecciones cutáneas • Afecciones ginecológicas • Reumatismo • Diabetes 	Baños, duchas y bebida
Oligominerales	<ul style="list-style-type: none"> • Afecciones del aparato digestivo • Afecciones hepáticas, litiasis • Afecciones de vías urinarias, litiasis • Afecciones reumáticas • Gota • Afecciones ginecológicas • Secuelas de traumatismos • Afecciones alérgicas • Afecciones respiratorias 	Baños, duchas, inhalaciones y bebida

Fuente: TORTOSA R. 1986. p. 251.

1.3 Parámetros Físico-químicos del agua

1.3.1 Temperatura

La temperatura del agua tiene una gran importancia en el desarrollo de los diversos procesos que en ella se realizan, de forma que un aumento de la temperatura modifica la solubilidad de las sustancias. La actividad biológica aproximadamente se duplica cada diez grados (ley del Q10), aunque superado un cierto valor característico de cada especie viva, tiene efectos letales para los organismos. (AZNAR, A. 2000, p. 3)

1.3.2 pH

Es una medida de la concentración de iones hidronio (H_3O^+) en la disolución. En la medición del pH hay que tener presente que estas sufren variaciones con la temperatura. El rango de pH para aguas naturales oscila entre 4 y 9 y la mayoría son ligeramente básicas debido a la presencia de bicarbonatos y carbonatos de metales alcalinos y alcalinotérreos. (GARAY-TINOCO, J., et al. 2003, p 22)

1.3.3 Conductividad

Es un indicativo de la concentración de las sales disueltas y mide la cantidad de iones especialmente de Ca, Mg, Na, P, bicarbonatos, cloruros y sulfatos. Se mide en micromhos/cm o Siemens/cm. (SIERRA, C. 2011, p. 60)

1.3.4 Sólidos totales disueltos (STD)

STD es una medida de la materia en una muestra de agua, es decir agrupa todos los minerales, metales, y sales disueltas en el agua y es un buen indicador de la calidad. Éste estándar secundario se establece porque los STD elevados proporcionan al agua una apariencia turbia y disminuye el sabor. (ADAM, W & BAUDER, J. 2012. p. 1)

1.3.5 Color

Aunque está íntimamente ligado a la turbidez, el color en el agua puede considerarse como una característica independiente. Mientras que la turbiedad se considera ocasionada por partículas de gran tamaño (diámetros > 10-3mm), el color se considera generado por sustancias disueltas y por los coloides. (SIERRA, C. 2011, p. 56)

1.3.6 Olor

Generalmente los olores son producidos por sustancias volátiles (COV's) o gaseosas (H₂S, NH₃, etc.), y suelen ser debidos a materia orgánica en descomposición, y sustancias propias de la tierra. (AZNAR, A. 2000, p. 4)

1.4 Los microorganismos

Los microorganismos son aquellos seres vivos más diminutos y numerosos que existen en la tierra, pueden colonizar distintos ambientes como: suelo, agua y aire, están en interacción continua con las plantas, los animales y el hombre. Se agrupan en dos categorías: procariotas (archaeas y bacterias) y eucariotas (hongos, algas y protozoarios). No obstante, también los virus, viroides y priones son considerados microorganismos. (MONTAÑO, N., et al. 2010, p. 15)

En la actualidad existen microorganismos de vital importancia como las bacterias de las aguas termales ya que estudios recientes indican que éstas participan en procesos metabólicos, ecológicos y biotecnológicos de vital importancia para la medicina y farmacia. (MONTAÑO, N., et al. 2010, p. 17)

Existe gran diversidad de géneros y especies de microorganismos en un mismo hábitat o ambiente, esto depende de la relación entre los microorganismos y el ambiente, la diversidad microbiana puede apreciarse en términos de variedad estructural y funcional de los microorganismos, así como sus variaciones en el tamaño, morfología, división celular, o en la capacidad metabólica y de adaptación.

Entre las características generales de las bacterias podemos citar las que están en función de la pared celular, morfología, tipo de respiración, formación de esporas, movilidad, etc.:

- Bacterias Gram positivas: estas sintetizan una pared de una capa compuesta básicamente por peptidoglicano y que carece de membrana externa. (MADIGAN, Michael et al. 2004. p. 56).
- Bacterias Gram negativas: poseen una pared con al menos dos capas estructuralmente distintas (MARÍN, Rafael. 2003. p. 75). Estas bacterias contienen poco peptidoglicano y presenta una membrana externa compuesta por lipopolisacárido, lipoproteína y otras macromoléculas complejas. (MADIGAN, Michael et al. 2004. p. 56).

- Otras de las características generales de las bacterias están relacionadas con la morfología microscópica, es decir que tanto las bacterias Gram positivas y Gram negativas pueden ser esféricas (cocos) o alargadas (bacilos) como se aprecia en la figura 2-1. Algunas como *Arthrobacter* pueden formar células de diferente forma y tamaño. (MARÍN, Rafael. 2003. p. 75)
- La respiración puede ser aerobia o anaerobia (fermentadoras), otras pueden formar endosporas que resisten altas temperaturas, radiación y agentes tóxicos, además algunas son inmóviles y otras tienen movilidad mediante flagelos, algunas bacterias Gram negativas como las espiroquetas se mueven mediante las fibrillas axiales estrechamente enroscadas a la célula bacilar y encerrada por la pared celular. (MARÍN, Rafael. 2003. p. 75)

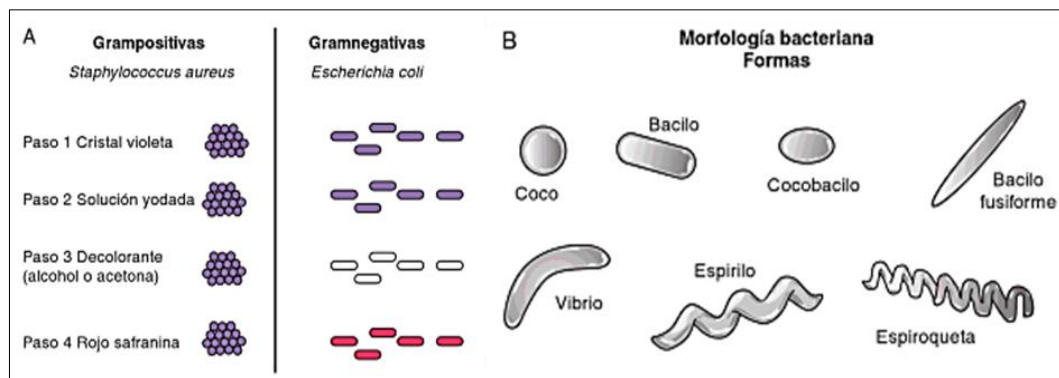


Figura 2-1. (A) Morfología de las bacterias según la tinción Gram. (B) Morfología de las bacterias

Fuente: MURRAY, Patrick., et al. 2009. p. 13.

1.4.1 Características microbiológicas de las aguas termales

La microbiota del agua la conforman dos grupos: (a) microorganismos autóctonos, cuyo hábitat es únicamente el agua, y (b) los microorganismos alóctonos. (MARÍN, Rafael. 2003. p. 75)

No obstante, dado que el agua subterránea es pobre en sustancias nutritivas el contenido bacteriano, salvo contaminación, no es alto. (MARÍN, Rafael. 2003. p. 75)

1.4.1.1 Microorganismos autóctonos

Los microorganismos autóctonos son aquellos que conforman la microbiota propia del agua, tienen la característica de crecer en medios de cultivo pobres en carbono, además el tiempo de incubación tiene que ser prolongado ya que muchos de estos microorganismos son metabólicamente inactivos y como consecuencia de ello no se multiplican. (DE LA ROSA, M^a del Carmen., & MOSSO, M^a Ángeles. 2000. p. 155)

La diversidad de microorganismos autóctonos del agua depende de la composición mineral y temperatura del medio acuático, así como también de los requerimientos nutricionales de los microorganismos.

1.4.1.1.1 Microorganismos autóctonos según la composición mineral del agua

Existen microorganismos propios de los manantiales de aguas sulfurosas un ejemplo son las bacterias que oxidan el azufre, a este grupo pertenecen los géneros *Beggiatoa*, *Thermothrix*, *Thiobacillus*, así como bacterias sulfatorreductoras como el *Desulfotomaculum* y *Desulfovibrio*, estas últimas se consideran nocivas porque producen corrosión en las conducciones de hierro debido a la producción de sulfhídrico. (DE LA ROSA, M^a del Carmen., & MOSSO, M^a Ángeles. 2000. p. 155)

Los géneros *Clonothrix*, *Leptothrix*, *Leucothrix*, *Sphaerotilus* se encuentran en manantiales de aguas ferruginosas tienen la particularidad de oxidar el ión ferroso a férrico, muchas de estas bacterias son filamentosas y producen precipitados de óxido e hidróxido férrico que pueden originar obstrucciones y biocorrosiones en las conducciones. (DE LA ROSA, M^a del Carmen., & MOSSO, M^a Ángeles. 2000. p. 156)

Las bacterias halófilas moderadas (*Halomonas*, *Micrococcus*, *Vibrio*) y halotolerantes (*Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Planococcus*) que resisten una alta osmolaridad debido a complejos mecanismos de regulación interna forman parte de la microbiota de los manantiales de aguas cloruradas sódicas e hipertónicas. (DE LA ROSA, M^a del Carmen., & MOSSO, M^a Ángeles. 2000. p. 156)

1.4.1.1.2 Microorganismos autóctonos según la temperatura del agua

La temperatura influye en forma directa en el tipo de microbiota, en las aguas hipertermales predominan las bacterias Gram positivas. En las aguas mesotermales predominan los bacilos Gram negativos y cocos Gram positivos, esta diferencia radica en que las bacterias Gram positivas son más resistentes al calor.

En estos dos tipos de aguas los principales géneros identificados son: *Pseudomonas* (*P. fluorescens* y *P. putida*), *Bacillus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Enterobacter*, *Acinetobacter* y *Arthobacter*, otros bacilos Gram negativos como *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Vibrio* y *Aeromonas*, además de otros géneros de cocos presentes como *Vagococcus*, *Planococcus*, *Marinococcus*, en ocasiones principalmente en aguas hipertermales, se encuentran bacilos irregulares como *Arthobacter*, *Kurthia*, *Corynebacterium*, *Cellulomonas*, *Exiguobacterium*, *Rubrobacter*, y otros géneros difíciles de identificar. (MOSSO, María de los Ángeles., et al. 1994. p. 372)

La temperatura óptima de crecimiento de los microorganismos permite clasificarlos de la siguiente manera:

Bacterias termófilas que crecen a más de 45°C pero la mayoría de las bacterias que conforman la microbiota autóctona de las aguas termales son mesófilas con temperaturas óptimas de crecimiento a 37°C, que se adaptan a condiciones de elevada temperatura. (DE LA ROSA, M^a del Carmen., & MOSSO, M^a Ángeles. 2000. p. 155)

Los aerobios mesófilos son aquellos microorganismos que se desarrollan en presencia de oxígeno libre (PASSALACQUA, Nancy. 2014. p. 5). El recuento de estos microorganismos estima la flora total sin especificar tipos de gérmenes, es decir no evidencia la presencia de patógenos o sus toxinas. Un recuento de aerobios mesófilos bajo no asegura que una muestra esté exenta de patógenos o sus toxinas; tampoco un recuento alto indica, presencia de flora patógena. (PASCUAL, María., & CALDERÓN, Vicente. 2000. p. 13)

Otro grupo de microorganismos son los hipertermófilos que tienen la característica de crecer a más de 80°C, es decir se los encuentra en manantiales muy calientes.

1.4.1.1.3 Microorganismos autóctonos según los nutrientes del agua

La microbiota autóctona varía según los nutrientes del agua como consecuencia de ello encontramos diferentes grupos de microorganismos, entre estos tenemos a las bacterias heterótrofas oligotróficas, con escasos requerimientos de carbono y nitrógeno (oligocarbofílicas y oligonitrofilicas), estas bacterias no suelen fermentar los azúcares pero poseen otras actividades es decir pueden ser: proteolíticas, amilolíticas, amonificantes y en menor número celulolíticas. (DE LA ROSA, M^a del Carmen., & MOSSO, M^a Ángeles. 2000. p. 155)

En menor cantidad se encuentran los microorganismos autótrofos, tanto quimiolitotrofos como fototrofos (cianobacterias, bacterias verdes y rojas). Estas bacterias se consideran beneficiosas ya que actúan en procesos de autodepuración, si el agua está contaminada con materia orgánica. (DE LA ROSA, M^a del Carmen., & MOSSO, M^a Ángeles. 2000. p. 155)

Entre las bacterias heterótrofas Gram negativas se encuentran las *Pseudomonas* y géneros afines (*Comamonas*, *Stenotrophomonas*, etc.), flavobacterias, *Acinetobacter*, así como micrococos, bacilos endosporulados, algunos actinomicetos y géneros típicos de bacterias del suelo como *Arthrobacter*, entre las Gram positivas. (ZAFRA, Irene. 2000. p. 171)

Otros géneros propios de los manantiales termales son *Brevundimonas spp*, *Burkholderia cepacia*, *Ralstonia pickettii*, *Comamonas spp*, *Acinetobacter spp* y *Alcaligenes spp*. También se pueden encontrar patógenos oportunistas para el hombre. (FLORES, S. 2013. p. 10)

Las aguas de manantiales termales pueden contener otros microorganismos que no son capaces de desarrollarse en los medios de cultivo recomendados por las normativas de análisis de agua, estas bacterias son denominadas como no cultivables, aunque en realidad deberían ser nombradas como todavía no cultivadas. (ULTEE, A., et al. 2004. p. 560)

1.4.1.2 Microorganismos alóctonos

Son aquellos microorganismos que no son propios de las aguas termales, estos proceden principalmente del suelo que está en contacto directo con las aguas subterráneas, manantiales arroyos, etc., además este tipo de microorganismos permanecen vivos un tiempo limitado en el agua. (MARÍN, Rafael. 2003. p. 75)

1.4.1.2.1 Importancia de los microorganismos alóctonos

Los microorganismo alóctonos son importantes desde un punto de vista sanitario, teniendo en cuenta que las aguas termales no contienen bacterias patógenas ni indicadores fecales, no obstante los microorganismos alóctonos proceden de factores externos que tengan contacto con los manantiales termales, entre estos factores tenemos la vegetación y la fauna cercanas al punto de surgencia del agua, así como también la presencia de los bañistas. (DE LA ROSA, M^a del Carmen., & MOSSO, M^a Ángeles. 2000. p. 155)

1.4.1.3 Microorganismos alóctonos usados como indicadores sanitarios

La microbiota aloctona no siempre indica riesgo sanitario esto depende de la cantidad y tipos de géneros además de la adaptación de las bacterias a las condiciones de las aguas termales, ya que en ciertos manantiales se han detectado coliformes, enterococos, *Clostridium sulfito reductor* y *Pseudomonas aeruginosa*. (LECHEVALLIER, Mark., et al. 1987. p. 2716)

Pseudomonas aeruginosa por ser un patógeno oportunista su presencia no es deseable ya que puede causar infecciones en personas inmunodeprimidas, aunque puede colonizar ambientes acuáticos y encontrarse en aguas subterráneas no contaminadas por el hombre. (LECLERC, Hemi., & MOSSSEL, D.A.A. 1989. p. 592)

Los principales microorganismos alóctonos analizados en el agua son los del grupo coliforme, especialmente *Escherichia coli*.

1.4.1.3.1 Coliformes totales

El grupo de coliformes totales son indicadores de contaminación humana o animal aunque también pueden proceder del suelo, polvo y agua, incluye los géneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Edwardsiella* y *Citrobacter*, viven como saprófitos independientes o como bacterias intestinales (ARCOS, M., et al. 2005, p. 72).

Forman parte de la familia *Enterobacteriaceae*, son bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos, no esporulantes, fermentan la lactosa, producen gas. (PRESCOTT, Lansing., et al. 1996, p. 68)

1.4.1.3.2 *Escherichia coli*

El principal indicador de contaminación fecal es *Escherichia coli*, bacteria de interés clínico, ya que provocan infecciones oportunistas en el tracto respiratorio superior e inferior, bacteremia, infecciones de piel y tejido blando, enfermedad diarreica aguda, etc., (MOORE, J., et al. 2002. p. 24). Es una bacteria Gram negativa, anaerobia facultativa, forma parte de la microbiota normal del intestino del ser humano y los animales homeotermos, fermenta la lactosa y puede llegar a crecer hasta 45 °C. (LARREA, J., et al. 2009. p. 493)

El tiempo de sobrevivencia de *Escherichia coli* en su hábitat primario (intestino) se ha estimado en dos días, pero en el hábitat secundario (ambiente externo), tiene una supervivencia de aproximadamente 24 horas en agua, 36 horas en sedimentos y 72 horas en el suelo. (WINFIELD, Mollie., & GROISMAN, Eduardo. 2003. p. 3688)

En el medio acuático las bacterias del tracto intestinal no suelen sobrevivir, por causa de un estrés fisiológico pierden la capacidad de producir colonias en medios diferenciales y selectivos, el tiempo de vida depende de la temperatura, luz solar, poblaciones de otras bacterias, y la composición química del agua, por lo tanto la presencia de coliformes en el agua indica contaminación bacteriana reciente. (FERNÁNDEZ, M., et al. 2001. p. 9)

1.4.1.4 Otros microorganismos

Entre otros microorganismos alóctonos que podemos encontrar en el agua están los eucariotas (hongos), y un indicador no habitual como *Staphylococcus aureus*.

1.4.1.4.1 Hongos

Los hongos son organismos eucariotas poseen gran capacidad de adaptación y pueden desarrollarse sobre cualquier medio o superficie, en este grupo se incluyen los hongos filamentosos, también llamados mohos y los hongos unicelulares, llamados levaduras. (GARCÍA, V. 2004, p. 85)

Mohos: hongos multicelulares, filamentosos, cuyo crecimiento en los alimentos se conoce fácilmente por su aspecto aterciopelado o algodonoso. Están constituidos por filamentos ramificados y entrecruzados, llamados "hifas", cuyo conjunto forma un "micelio" que puede ser coloreado o no. (INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN NTE INEN 1529-10:2013. p. 1)

Levaduras: son hongos cuya forma de crecimiento habitual y predominante es unicelular, poseen una morfología muy variable que puede ser esférica, ovoidea, piriforme, cilíndrica, triangular o, incluso alargada en forma de micelio verdadero o falso. Su tamaño supera al de las bacterias. (INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN NTE INEN 1529-10:2013. p. 1)

En las aguas termales se han reportado en menor número principalmente mohos de los géneros: *Penicillium*, *Aspergillus* y *Alternaria*, géneros que no afectan a la calidad sanitaria cuando se encuentran en bajo número. (DE LA ROSA, M^a del Carmen., & MOSSO, M^a Ángeles. 2000. p. 156-157)

1.4.1.4.2 *Staphylococcus aureus*

Dentro del género *Staphylococcus* se incluyen 32 especies de estas 12 se encuentran colonizando al ser humano, siendo *S. aureus*, sin duda, la principal dentro del mencionado género. (RIVERA, P. 2014, p. 37)

Los *Staphylococcus aureus*, tienen forma de cocos, se agrupan formando racimos, son inmóviles, Gram positivos, aerobios y anaerobios facultativos, con una temperatura de crecimiento óptima de 37° C, estas bacterias excretan un pigmento amarillo dorado y son halotolerantes. (NTE INEN 1529-14:2013. p. 1)

Estos microorganismos son típicos de la microflora habitual de la piel, y pueden ser transmitidos por medios acuáticos, por lo tanto es necesario que se los analice en aguas de piscinas ya que son indicadores de riesgo para la salud. (MARÍN, R., 2003. p. 122)

1.5 Recuento e identificación de microorganismos

El recuento de microorganismos indicadores habituales (coliformes totales, *E. coli*, y aerobios mesófilos), así como los indicadores no habituales (*S. aureus*, mohos y levaduras) se basan en el número de colonias que se desarrollan en placas previamente inoculadas con una cantidad conocida de agua e incubadas en unas condiciones ambientales determinadas, estos recuentos no pueden considerarse como recuentos totales ya que solo son susceptibles del conteo aquellos microorganismos capaces de crecer en las condiciones establecidas. (RIVERA, P. 2014, p. 41)

1.5.1 Placas Petrifilm

Son placas que contienen medios de cultivo listos para usar permitiendo un ahorro de tiempo, son diseñadas para incrementar la productividad y consistencia proporcionando resultados reproducibles de alta eficiencia reduciendo los errores de los métodos tradicionales, además tiene costes más bajos en comparación con otros métodos de análisis microbiológicos. El recuento de microorganismo en placas 3M™ Petrifilm™ es un método reconocido por la AOAC™ INTERNATIONAL como método oficial de análisis (OMA). (SEGURIDAD ALIMENTARIA 3M S.A. 2015)

1.5.2 Sistemas de identificación

Actualmente, la identificación bacteriana se realiza por medio de métodos tradicionales basados en las características fenotípicas, puesto que su realización y costo los hace más asequibles, otra forma de identificación son los métodos moleculares. (BOU, G., et al. 2011. p. 603)

1.5.2.1 Sistemas de identificación tradicionales

Los esquemas tradicionales de identificación fenotípica bacteriana se basan en las características observables de las bacterias, como rasgos macroscópicos, morfología microscópica (tinción Gram), desarrollo, propiedades bioquímicas, fisiológicas y metabólicas. El cultivo, cuando es factible, continúa siendo el método diagnóstico de elección; permite el aislamiento del microorganismo implicado y su identificación. (BOU, G., et al. 2011. p. 603)

1.5.2.1.1 Pruebas Bioquímicas

Entre las pruebas bioquímicas que se utilizan en la identificación preliminar están la catalasa y oxidasa; otras pruebas incluyen la ureasa producción de sulfuros e indol; la óxido-fermentación de Hugh Leifson, Agar hierro de Kligler, fermentación de azúcares, hidrólisis de la gelatina y almidón, utilización de citratos, entre otros (cuadro 2-1). (DE LA ROSA, M. C., et al. 2004. p. 528)

Cuadro 2-1. Usos de las principales pruebas bioquímicas utilizadas en microbiología.

PRUEBAS BIOQUÍMICAS	USOS
Prueba de oxidasa	Usada para determinar la presencia de las enzimas oxidasas.
Prueba de Catalasa	Usada para determinar la presencia de la enzima catalasa que descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno.
O.F. de Hugh & Leifson	Es utilizado en las pruebas bioquímicas de identificación bacteriana en base al metabolismo oxidativo-fermentativo de las bacterias Gram negativas.
Kligler Hierro Agar	Usado para la diferenciación de Enterobacterias, en base a la fermentación de hidratos de carbono y a la producción de H ₂ S.
SIM (sulfuro, indol, motilidad)	Medio semisólido destinado a verificar la movilidad, producción de indol y H ₂ S por los microorganismos. Es útil para diferenciar miembros de la familia Enterobacteriaceae.
Prueba de Urea	Es utilizada para diferenciar microorganismos en base a la actividad ureásica.
Simmons Citrato	Utilizado para la diferenciación de Enterobacterias en base al uso citrato como única fuente de carbono y energía.
Hidrólisis de gelatina	Utilizado para determinar la capacidad de un microorganismo para producir enzimas proteolíticas que licúan la gelatina (gelatinasas).
Hidrólisis de almidón	Utilizado para determinar la capacidad de un microorganismo de hidrolizar el almidón por medios enzimáticos (Amilasas).

Fuente: MacFaddin, Jean. 2003.

Realizado por: Guaila R. 2015

1.5.2.2 Sistemas de identificación comerciales manuales o galerías multipuebas

Existen numerosos sistemas o equipos multipuebas con el fin de conseguir una mayor rapidez en la identificación de algunas bacterias. Todos exigen unas condiciones muy precisas de concentración del inóculo, incubación y de lectura, que si no se observan pueden dar lugar a importantes errores. (BOU, G., et al. 2011. p. 603)

Las galerías multipuebas se tratan de celdillas aisladas con sustrato liofilizado que se inoculan individualmente y que permiten realizar simultáneamente entre 10 y 50 pruebas bioquímicas. Los resultados de las pruebas se expresan de forma numérica (se agrupan de tres en tres, de manera que el resultado de cada trío de pruebas queda reducido a un dígito). Cada especie está definida por un código numérico, resultado de la codificación de las reacciones a las pruebas que se hubieran utilizado. (BOU, G., et al. 2011. p. 603)

1.5.2.2.1 El sistema de identificación *MicrogenTM GN-ID*

Este sistema de multipuebas utiliza 12 pocillos (GN A) o 24 pocillos (GN A+B) en cada uno se encuentran sustratos bioquímicos estandarizados, para identificar la familia *Enterobacteriaceae* y otros bacilos no-exigentes Gram negativos (oxidasa positivos y negativos). (MICROGEN BIOPRODUCTS. 2004. pp. 1-21)

1.6 Resistencia a antibióticos en bacterias del agua

En la actualidad nada se ha podido hacer para prevenir la aparición de nuevas resistencias a los antibióticos, pues son eventos que ocurren al azar y representan un aspecto particular en la evolución bacteriana. (COURVALIN, P. 2008. pp. 6-8).

Las investigaciones de patrones de resistencia se enfocan en poblaciones de bacterias patógenas, sin embargo las bacterias ambientales también son reservorios comunes de genes de resistencia a antibióticos. Por esta razón la información obtenida en las investigaciones de bacterias patógenas no es representativa de la totalidad de bacterias. (VALENCIA, P., et al. 2009, p. 17)

El estudio de bacterias en ecosistemas naturales es muy relevante, ya que permite identificar reservorios ambientales con bacterias que poseen genes de resistencia a antibióticos. Estos microorganismos podrían transmitir los genes de resistencia a antibióticos mediante plásmidos y transposones durante el proceso de conjugación, los cuales no solo contienen determinantes de

resistencia a antibióticos, sino también otras determinantes tales como los que confieren resistencia a determinados metales pesados. (LIMA-BITTENCOURT, C. I., et al. 2007. p. 522)

Adicionalmente, en el ambiente existen una serie de bacterias que no han sido cultivadas, por lo cual la mayor parte de genes de resistencia a antibióticos caracterizados provienen de bacterias cultivables. (VALENCIA, P., et al. 2009, p. 17)

La resistencia a un antibiótico puede ser natural o intrínseca, esta se puede dar debido a mutaciones, permeabilidad reducida, variación en las rutas metabólicas, o por genes que inactivan o modifican el punto de acción del antibiótico, etc. (VALENCIA, P., et al. 2009, p. 17)

En la figura 3-1 se puede observar el efecto del uso de antibióticos sobre poblaciones bacterianas y como en presencia de estos se seleccionan las bacterias resistentes, y al mismo tiempo son eliminadas las bacterias sensibles.

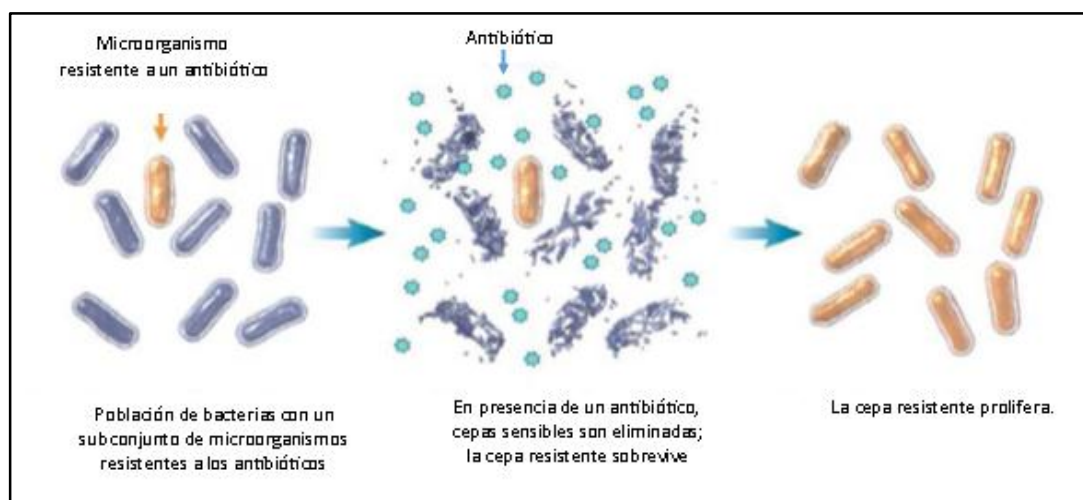


Figura 3-1. Microorganismos resistentes a antibióticos

Fuente: Navajas E. 2014. p. 8

1.6.1 Métalo β -lactamasas (grupo B)

Las métalo β -lactamasas son un grupo de enzimas producidas por bacilos Gram negativos para de esta forma adquirir mecanismos de resistencia no solo a imipenem y meropenem, sino también a otros antibióticos β -lactámicos. (GONZALES, E., 2012. p. 2)

El grupo más importante de enzimas carbapenemasas lo constituyen las métalo β -lactamasas pertenecientes a la clase B o grupo 3 de Bush y Jacoby. Las enzimas principales son las IMP (“Imipenemasas o activa sobre imipenem”) y VIM (“Verona integron-codified metallo- β -

lactamase”) que tienen un perfil hidrolítico que inhiben la acción de todos los antibióticos betalactámicos con la excepción del aztreonam, y no se inhiben por el ácido clavulánico, sulbactam o tazobactam. (NAVARRO, Ferran., et al. 2011. p. 528)

Estas enzimas poseen cuatro características principales: (i) Poseen actividad contra los carbapenemes, (ii) No hidrolizan los monobáctamicos como el aztreonam, (iii) Son inhibidas por quelantes como el EDTA o el Mercapto acetato de Sodio; y (iv) Requieren cationes divalentes, generalmente Zn^{+2} como cofactor para su actividad catalítica. (GONZALES, E., 2012. p. 1)

En la actualidad la mayor cantidad de casos de bacterias productoras de metalo β -lactamasas ha sido reportado a nivel hospitalario especialmente en *Enterobacterias*, *P. aeruginosa* y *Aeromonas spp.*, es decir en agentes patógenos de importancia clínica, sin embargo las bacterias de origen ambiental también podrían adquirir este mecanismo de resistencia debido a que las metalo β -lactamasas son codificadas por genes que en su mayoría están localizados en elementos genéticos tales como los integrones o insertados en elementos móviles como transposones y plásmidos. (GONZALES, E., 2012. p. 2)

1.7 Actividad antibacteriana de los microorganismos del agua.

Los antimicrobianos son sustancias químicas que impiden el desarrollo o favorecen la muerte de un microorganismo, pudiendo ser de tres tipos: *desinfectantes*, *antisépticos* y *antimicrobianos de uso clínico-terapéutico* a este último grupo pertenecen los antibióticos (sustancias sintetizadas por microorganismo) y quimioterápicos (sustancias de preparación sintética) capaces de reducir y controlar la presencia de microorganismos que han invadido los tejidos de un individuo. (SAENZ PEÑA. 2007. p. 1)

Las sustancias (metabolitos) producidas por algunos microorganismos tienen interacciones antagónicas de tipo bacteria-bacteria que involucran la inhibición de crecimiento del patógeno. Actualmente, el estudio de los metabolitos química y biológicamente activos influyen en el desarrollo y producción de nuevos compuestos para la industria farmacéutica, química, cosmética, suplementos nutricionales, biomoléculas, biocatalizadores, agroquímicos, etc. (LEÓN, J., et al. 2010. p. 215).

Por tal razón se hace cada vez más necesaria la búsqueda de nuevos metabolitos y para ello es imperativo la exploración de ambientes tradicionalmente no explotadas para estos fines, un reservorio importante es el agua, ya que los microorganismos acuáticos son fuente para el descubrimiento de nuevas drogas y compuestos activos. (LEÓN, J., et al. 2010. p. 215).

La lista de compuestos obtenidos a partir de microorganismos acuáticos nativos incluyen antimicrobianos, anticancerígenos y antiinflamatorios, muchos de los cuales pertenecen a clases químicas no descritas en microorganismos terrestres. Ejemplos de ello son dos productos naturales marinos de naturaleza anticancerígena la briostatina y la didemmina B. (MANCILLA, C., 2003. p. 6)

CAPÍTULO II

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Lugar de la investigación

Las muestras se recolectaron en el “Balneario de aguas termales Urauco”, el cual que está ubicado a una altura de 2773 m.s.n.m, en las faldas del volcán Guagua Pichincha, a 30 minutos de la parroquia Lloa, la misma que pertenece a la ciudad de Quito (Figura 4-2), (PREFECTURA PROVINCIAL DE PICHINCHA, 2012).



Figura 4-2. Ubicación del balneario de aguas termales Urauco, Lloa
Fuente: Hacienda hostería las Palmas, 2014

El Balneario de aguas termales Urauco tiene dos depósitos, el uno forma un manantial natural y el otro una piscina, en cada uno de ellos se estableció un punto de muestreo, los cuales se de tallan a continuación:

El primer punto de muestreo corresponde al manantial, donde el agua encontraba acumulada hasta la mitad en el momento de la recolección de la muestra.



Fotografía 1-2. Manantial natural

Fuente: Rolando Guaiña. 2015

El segundo punto de muestreo es la piscina, la muestra se recolectó en la naciente del afluente termal es decir en el punto de emergencia, en el momento que se realizó esta acción la piscina se encontraba vacía tal como se indica en la fotografía 2-2.



Fotografía 2-2. Punto donde emerge el agua en la piscina

Fuente: Rolando Guaiña. 2015

Las muestras se recolectaron el 02 febrero del año 2015 en los dos puntos anteriormente mencionados, y se trasladaron al laboratorio de Análisis Bioquímicos y Bacteriológicos de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH) para la ejecución de los análisis microbiológicos.

2.2 Factores de estudio

- Población: Aguas termales del Balneario Urauco
- Muestras: agua termal del manantial y la piscina

2.3 Materiales, equipos, reactivos y medios de cultivo.

2.3.1 Materiales

- Envases de plástico estériles
- Coolers
- Guantes
- Mascarilla
- Cofia
- Palillos de dientes
- Matraz Erlenmeyer
- Pipetas automáticas
- Puntas para pipeta
- Probetas
- Reverbero eléctrico
- Tubos de ensayo
- Lámpara de alcohol
- Placas porta objetos
- Cajas Petri

2.3.2 Equipos

- Multiparámetro
- Estufa bacteriológica
- Cámara de flujo laminar
- Balanza analítica
- Autoclave
- Refrigeradora
- pH metro
- Microscopio
- Computadora

2.3.3 Medios de cultivo

- Mueller Hinton Agar (MERCK)
- Placas 3M™ Petrifilm™
- Pruebas Microgen™ GN-ID Identificación
- Caldo cerebro corazón (MERCK)
- Agar Mc Conkey (Difco™)
- Agar eosina azul de metileno (acumedia)
- Agar Kligler (MERCK)
- Agar SIM (BBL™)
- Agar citrato (MERCK)
- Agar urea (MERCK)
- Agar manitol salado (BBL™)
- Agar gelatina
- Agar almidón
- Agar Hugh – Leifson O-F

2.3.4 Reactivos

- Kit para tinción GRAM (cristal violeta, lugol, alcohol cetona y safranina)
- Aceite de inmersión
- Reactivo de Kovac's
- Alcohol antiséptico
- Peróxido de hidrogeno (Weir)
- Agua destilada
- Suero fisiológico
- Tiras para oxidasa (OxiStrips™)

2.4 Métodos y técnicas

2.4.1 Toma de muestras

Las muestras fueron recolectadas a medio día, se usaron recipientes de plástico estériles de 150 mL (frascos para muestra de orina), la cantidad de agua recolectada en cada punto fue de 100 mL aproximadamente, el procedimiento se realizó manualmente tal como se detalla a continuación:

- Se bajó el frasco formando un ángulo de 45° con la horizontal en relación al agua.

- Luego se saca la tapa, al mismo tiempo que el frasco se introduce en el agua moviéndola despacio contra la corriente mientras se llena, para evitar que el agua que toca la mano entre en el frasco.
- Cuando el envase se llenó las tres cuartas partes de su capacidad se retiró del agua, se colocó la tapa, y se transportó al laboratorio. (GUEVARA, A., 1996, p. 10-11)

Cada frasco fue rotulado, identificando la fecha y el lugar de procedencia, acompañado de parámetros *in situ* como: descripción de cada sitio, hora en que se tomó la muestra, temperatura del agua y del ambiente, conductividad, sólidos totales, características organolépticas (color, olor).

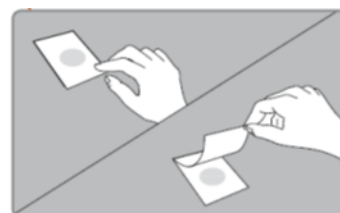
Las muestras se trasladaron al laboratorio de Análisis Bioquímicos y Bacteriológicos de la Facultad de Ciencias a temperatura ambiente y en oscuridad, utilizando un cooler, se realizó los análisis microbiológicos de cada muestra por duplicado antes de las 24 horas.

2.4.2 Análisis microbiológico

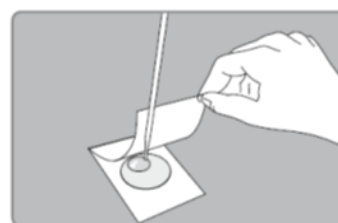
2.4.2.1 Recuento de: aerobias mesófilas, *Escherichia coli*, coliformes totales, *Staphylococcus aureus*, mohos y levaduras utilizando el Método Placas 3M™ Petrifilm™.

2.4.2.1.1 Técnica de Petrifilm™ según 3M™, 2009.

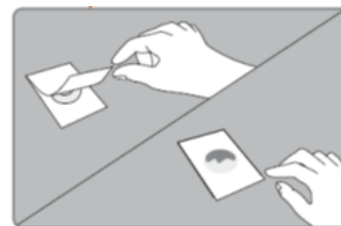
Disponer la placa Petrifilm en una superficie plana. Levantar el film superior.



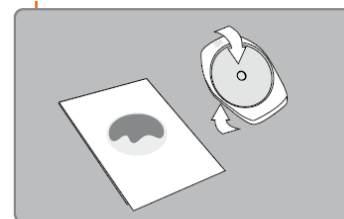
Pipetear 1 ml de agua al centro aproximadamente del film inferior. Mantener la pipeta en posición vertical. No tocar el film inferior mientras se pipetea.



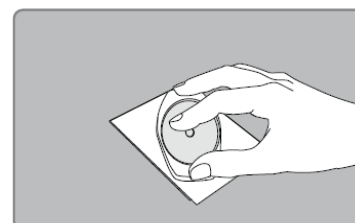
Soltar el film superior y dejarlo caer, evitando introducir burbujas. No deslizar el film hacia abajo.



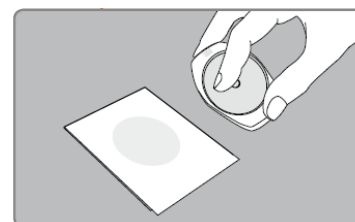
Colocar el aplicador en el film superior bien centrado sobre el inóculo. Usar el aplicador con la cara rebajada hacia abajo (cara lisa hacia arriba).



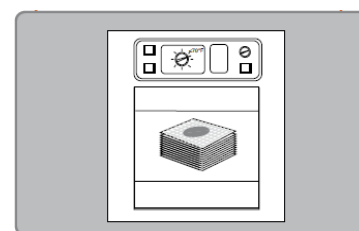
Aplicar presión de manera suave sobre el aplicador para distribuir el inóculo por toda la zona circular. No mover ni girar el aplicador.



Levantar el aplicador. Esperar 1 minuto para que se solidifique el gel.



Incubar las Placas 3M™ Petrifilm™ cara arriba y apiladas en grupos de no más de 20. Aerobios mesófilos 30°C durante 48 horas, coliformes totales y fecales a 37 °C durante 48 horas, *Staphylococcus áureus* a 37°C durante 24 horas, mohos y levaduras a 25-28°C durante 5 días.



Se realizó el conteo del número de colonias crecidas en las placas y se expresó los contajes como unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/mL).

2.4.2.2 Selección y estabilización de las colonias bacterianas

Para el aislamiento de las colonias se seleccionó las que presentaron distintas características macroscópicas tomando en cuenta el tamaño, forma y color. Las colonias se aislaron de las placas

Petrifilm™ de: aerobios mesófilos, *Staphylococcus aureus* (Staph express), coliformes fecales y totales (*E. coli*/coliformes).

Con la ayuda de un palillo de madera estéril se tomó una colonia de las placas Petrifilm™, para inocularla en cajas Petri que contenían agar Mueller Hinton, estas cajas contenían una cuadrícula en el fondo, y en cada espacio se inoculó una colonia distinta, de las anteriormente seleccionadas. Se incubaron durante 24 horas a 35 °C.

La estabilización del aislado bacteriano se consiguió con un mínimo de cuatro o más repiques, es decir repitiendo las indicaciones de párrafo anterior, y de esta manera se consiguió conservar las características de las colonias inoculadas. Con el último repique en el cual estaban ya estabilizados los aislados bacterianos, se realizó una siembra por agotamiento para obtener clones puros. (GUZMAN, Esteban. 2011. p. 23)

2.4.2.3 Obtención de clones puros, mediante siembra por agotamiento.

Esta operación se realizó con la finalidad de obtener un solo tipo de microorganismo, para lo cual se usó un medio sólido (agar Mueller Hinton), se procedió de la siguiente manera:

- Tomar una asada del cultivo y colocarla sobre el agar, cerca de la pared de la caja Petri y distribuir el inóculo en una pequeña sección.
- Esterilizar el asa y dejarla enfriar
- Rotar la placa unos 45° e inclinarla lo suficiente para poder observar la zona rayada. Volver a tocar con el asa la zona recién inoculada. Esparcir ahora el inóculo sobre una pequeña sección del agar con movimiento suave para no romper la superficie del medio. Trazar líneas lo más seguidas posibles, pero sin que se traslapen.
- Rotar nuevamente la placa unos 45° más y proceder como en el punto anterior. Girar nuevamente la placa y terminar de rayar la superficie, repetir una cuarta vez el rayado.
- Incubar las placas a 35°C. (RODRÍGUEZ, E., et al. 2005, p. 107)



Figura 5-2. Siembra por agotamiento
Fuente: RODRÍGUEZ, Evelyn., et al. 2005. p. 107

2.4.2.4 Descripción morfológica macroscópica de las colonias bacterianas

Según AQUIAHUATL, M y PÉREZ, M. (2004. p. 41), se deben observar las siguientes características:

- Color
- Tamaño
- Forma: circular, irregular, filamentosa o rizoide
- Borde: entero, lobulado, aserrado
- Superficie: lisa o rugosa
- Aspecto: húmeda, seca
- Elevación: convexa, plana, hundida
- Luz transmitida: translúcida, opaca
- Consistencia: dura, blanda, mucoide.

2.4.2.5 Tinción Gram de las colonias individuales obtenidas por agotamiento

- Tomar la colonia con la ayuda de un asa estéril.
- Con la ayuda de un mechero, fijar el extendido por calor.
- Cubrir la extensión con cristal violeta y dejar actuar durante un minuto.
- Lavar con agua corriente, cuidando que no se arrastre la preparación y sacudir para eliminar el exceso de agua.
- Cubrir la extensión con solución de lugol y dejar actuar por un minuto.
- Lavar con agua corriente.
- Decolorar con la solución decolorante (alcohol-cetona), aproximadamente 30 segundos.

- Lavar con agua corriente.
- Cubrir la extensión con Safranina y dejar actuar por 1 minuto.
- Secar la preparación a temperatura ambiente.
- Colocar una gota de aceite de inmersión sobre la preparación y observar al microscopio con el lente de 100X. (ALVAREZ, María., & BOQUET, Ernesto. 1995. P. 24)

2.4.2.6 Identificación de las colonias bacterianas puras

Se realizaron las Pruebas bioquímicas según las indicaciones de MacFaddin (2003), complementadas por las pruebas recomendadas por Barrow y Feltham (1993) y para algunas cepas se realizaron las pruebas Microgen™ GN-ID Identificación, para determinar género y especie.

Antes de realizar las pruebas bioquímicas se procedió a sembrar las colonias aisladas en agar Mac Conkey para evaluar el crecimiento de *Enterobacterias*, verificar la presencia de microorganismos fermentadores de lactosa y confirmar la presencia de bacilos Gram negativos, ya que la flora Gram positiva es inhibida por el cristal violeta que contiene este medio de cultivo.

Para los bacilos Gram positivos y Gram negativos se realizó las pruebas de oxidasa, catalasa, movilidad, O/F de Hugh y Leifson, Kligler, producción de sulfuros e indol, ureasa, citrato; mientras que las pruebas de hidrolisis de almidón y gelatina se realizó únicamente a los bacilos Gram positivos. Las colonias para realizar las pruebas bioquímicas se inocularon desde los cultivos de agar Mueller Hinton.

2.4.2.6.1 Pruebas bioquímicas

Las pruebas bioquímicas utilizadas fueron las siguientes:

PRUEBA DE OXIDASA: esta prueba determina indirectamente la presencia de la citocromo c oxidasa, la misma que cataliza la oxidación del citocromo c reducido (cit. C red.), el que a su vez oxida el reactivo empleado, dando un complejo coloreado. Se utilizó las tiras de papel (OxiStrips™) que están impregnadas con N,N,N',N'- tetrametil-p-fenilendiamina dihidrocloruro, la oxidación del mismo se detecta como color azul-purpura. (RODRÍGUEZ, Evelyn., et al. 2005. p. 213-214)

Técnica: con un palillo de madera estéril se tomó una pequeña cantidad de colonia de y se la impregnó en la tira. Inmediatamente se observó el cambio de color. Si la zona del papel inoculada con la bacteria se torna azul, purpura o morado hasta después de 30 segundos es positivo, si no hay cambio de color es negativo. (RODRÍGUEZ, E., et al. 2005. p. 213-214)

PRUEBA DE CATALASA: La catalasa es una enzima que poseen la mayoría de las bacterias aerobias. Descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. El desprendimiento de burbujas procedentes del oxígeno indica que la prueba es positiva. (Universidad de Granada. 2015. p. 1)

Técnica: en un portaobjetos se colocó una gota de agua oxigenada 10 volúmenes, y con un palillo de madera estéril se suspendió una porción de la colonia, y se observó la formación burbujas. (UNIVERSIDAD DE GRANADA. 2015. p. 1)

PRUEBA DE HUGH Y LEIFSON OXIDACIÓN – FERMENTACIÓN (O/F): esta prueba se usa para determinar el metabolismo oxidativo o fermentativo de un hidrato de carbono o su falta de utilización. Algunas bacterias pueden metabolizar un hidrato de carbono (glucosa) sólo en condiciones aerobias, mientras que otras producen ácido tanto de modo aerobio como anaerobio. (MacFaddin. 2003. p. 354)

La producción de ácido por vía fermentativa se observó en el tubo recubierto con vaselina, por el cambio de color del indicador de violeta a amarillo y la producción de ácido por vía oxidativa se observó en el tubo sin recubrir, igualmente por el cambio de color en el indicador de violeta a amarillo. Las cepas que no modificaron el color se consideraron microorganismos inertes. (Barrow y Feltham. 1993)

Técnica: se inoculó por punción dos tubos del medio O/F de Hugh y Leifson. En uno de los dos tubos la superficie se cubrió con vaselina estéril, para crear condiciones de anaerobiosis. Se incubaron a 35°C 48 horas. (BARROW y FELTHAM. 1993)

REACCIÓN EN AGAR KLIGLER (KIA): Esta prueba es usada para determinar la fermentación de la glucosa, lactosa, la producción de H₂S y la producción de gas. El cambio de color del indicador (rojo de fenol) de rojo a amarillo indica fermentación. Si se fermenta solo la glucosa el cambio de color del medio ocurre solo en el fondo del tubo (Taco).

Si el microorganismo es capaz de fermentar glucosa y lactosa hay cambio de color tanto en la superficie (pico de flauta) como en el fondo. La formación de burbujas que rompen el medio indica presencia de gas como producto final de la fermentación y la producción de H₂S se manifiesta por la aparición de un precipitado color negro debido a la reducción de la sal de hierro. (FLORES, S., 2013. p. 38)

Técnica: Empleando asa en punta, se inocularon por siembra tanto por punción y estría (pico de flauta) con cepas de microorganismos, en tubos que contenían Agar Kligler y se incubaron a 35°C por 24 horas. (FLORES, S., 2013. p. 39)

REACCIÓN EN AGAR SEMISÓLIDO SIM (SULFURO-INDOL-MOTILIDAD): Esta prueba es usada para determinar la producción de sulfuros, indol y observar la motilidad de las bacterias. A partir del tiosulfato de sodio los microorganismos pueden generar ácido sulfhídrico que reacciona con el hierro presente formándose un compuesto de color negro.

El medio contiene caseína rica en triptona la cual es usada por ciertos microorganismos quienes finalmente producen indol, el cual es revelado por reactivos como el de Kovac's. La motilidad es visible ya que es un medio semisólido y siendo positivo el crecimiento se ve por fuera de la línea de siembra, en forma de turbidez alrededor del canal de siembra. La no motilidad se caracteriza por el crecimiento exclusivamente a lo largo de dicho canal. (MDM. 2013 p. 2)

Técnica: se inoculó por punción en el tubo y se inoculó a 35°C 24 horas. Para producción de indol: se adicionan 3 o 4 gotas (200 uL) de reactivo de Kovac's al tubo y se observa la producción de un anillo de color rojo (positivo). (MDM. 2013 p. 2)

PRUEBA DE UREASA: esta prueba es usada para determinar la capacidad de un microorganismo de hidrolizar la urea en dos moléculas de amoníaco por acción de la enzima ureasa. Los productos alcalinizan el medio de cultivo haciendo virar el indicador de color amarillo al rosado-rojo. (MacFaddin. 2003. p. 397)

Técnica: se inoculó por siembra tanto por punción y estría (pico de flauta) con cepas de microorganismos, y se inoculó a 35°C 24 horas los microorganismos que hidrolizan la urea el medio de cultivo es de color rosado-rojizo. Microorganismos que no hidrolizan la urea el medio de cultivo permanece de color amarillo. (MacFaddin. 2003. p. 402)

PRUEBA DE UTILIZACIÓN DEL CITRATO DE SIMMONS: Generalmente, los medios de cultivos empleados para esta prueba contienen citrato de sodio como única fuente de carbono, y fosfato de amonio como única fuente de nitrógeno. Las bacterias que utilizan el citrato también pueden utilizar el amonio como fuente de nitrógeno, lo que resulta en la producción de amoníaco (NH_3^+) y la alcalinización del medio por la conversión del (NH_3^+) en hidróxido de amonio (NH_4OH) que produce el viraje del indicador azul de bromotimol de verde a azul. Si el microorganismo no utiliza el citrato no se produce cambio de color en el medio este permanece verde. (FLORES, S., 2013. p. 39)

Técnica: se inoculó por siembra tanto por punción y estría (pico de flauta) con cepas de microorganismos, y se inoculó a 35°C 24 horas. (FLORES, S., 2013. p. 39)

PRUEBA DE HIDRÓLISIS DEL ALMIDÓN: La actividad amilolítica es decir la capacidad de un microorganismo hidrolizar el almidón se determinó utilizando agar almidón a pH 7,5. Se consideró reacción positiva cuando se evidenció la formación de un halo claro alrededor de las colonias luego de añadir lugol. (FLORES, M., et al. 2010, p. 89)

Técnica: Los bacilos Gram positivos se inocularon con un palillo de madera estéril en una caja que contenía agar almidón y se incubaron a 35 °C durante ocho días, luego se añadió 10 mL de lugol sobre las placas. (BARROW, G., & FELTHAM, R. 1993)

PRUEBA DE LICUEFACCIÓN DE LA GELATINA: esta prueba se usó para determinar la capacidad de un microorganismo de producir enzimas de tipo proteolítico (gelatinasas) que licúan/hidrolizan la gelatina o muestran cambios característicos debido a los productos de degradación. (MacFaddin. 2003. p. 160)

Técnica: Se realizó inoculando los bacilos Gram positivos con un palillo de madera estéril en el centro de una placa con medio de agar gelatina. Se incubó a 35°C durante ocho días. Cuando la colonia estuvo lo suficientemente desarrollada se recubrió la superficie del medio con unas gotas de cloruro mercúrico (BARROW, G., & FELTHAM, R. 1993. p. 203). Se consideró la prueba positiva al producirse una zona clara alrededor de la colonia.

2.4.2.6.2 Pruebas *MicrogenTM GN-ID* Identificación

Este sistema se utilizó para identificar algunas bacterias Gram negativas (oxidasa positiva), siguiendo las recomendaciones de la casa comercial.

Inoculación e Incubación

1. Se realiza una prueba de oxidasa del organismo aislado. Los organismos oxidasa positivos se identifica inoculando las galerías GN A y GN B.
2. Suspender una cepa pura obtenida de un cultivo de 18-24 horas en 5 mL de solución salina estéril al 0,85% para inocular en las galerías GN A y GN B. Se mezcla bien.
3. Se quita cuidadosamente la lámina adhesiva que sella los micropocillos.
4. Se añade 100µL de la suspensión bacteriana a cada pocillo de las tiras.
5. Después de la inoculación, se recubren los micropocillos marcados con un círculo negro (1,2 y 3 en la galería GN A; 20 y 24 en la galería GN B) con 3-4 gotas de aceite mineral. (Si el microorganismos es oxidasa positivo no añadir aceite mineral en el micropocillo 20)

6. Se sella la parte superior de las galerías con la cinta adhesiva que se retiró y se incuba a 35-37 °C.
7. Las galerías GN A y GN B se leerán después de 18-24 horas de incubación para las *Enterobacteriaceae* y luego de 48 horas para los aislados oxidasa positivos. (MICROGEN BIOPRODUCTS. 2004)

Lectura y adición de reactivos

Galería GN A

1. Se quita la lámina adhesiva y se anota todas las reacciones positivas con ayuda de la carta de color.
2. se añade los reactivos a los siguientes micropocillos:
 - a) Se añade 2 gotas de reactivo de Kovac's al pocillo 8. Se lee a los 60 segundos. Formación de color roja revela resultado positivo.
 - b) Se añade 1 gota del reactivo VP I y 1 gota del reactivo VP II al pocillo 10. Se lee tras los 15-30 minutos, Formación de color rosa/roja revela resultado positivo.
 - c) Se añade 1 gotas de reactivo TDA al pocillo 12. Se lee a los 60 segundos. Formación de color roja cereza revela resultado positivo.
3. Se hace el test de reducción de nitrato al pocillo 7 después de leer y se anota el resultado del test ONPG. Se añade 1 gota del reactivo de Nitrato A y 1 gota del reactivo de Nitrato B al pocillo y se leen después de 60 segundos. Un color rojo indica que el nitrato ha sido reducido a nitrito. Si el pocillo 7 se mantiene amarillo o incoloro después de la adición de los reactivos nitrato, se añade una pequeña cantidad de polvo de zinc. Esto indicará si el nitrato ha sido reducido a nitrógeno gas. Si se mantiene el color amarillo es negativo. (MICROGEN BIOPRODUCTS. 2004)

Galería GN B

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

- b) El pocillo de la arginina se interpreta diferente tras 24 y 48 horas de incubación: 24 horas Enterobacteriaceae (amarillo=negativo y verde/azul = negativo) y 48 horas los aislados oxidasa positivos (amarillo/verde = negativo y azul = positivo). (MICROGEN BIOPRODUCTS. 2004)

Identificación

1. Se anota los resultados en la hoja de resultados de Microgen GN-ID A+B, los substratos se han organizado en tripletes (set de tres reacciones).

Para codificar el dígito de un trí de pruebas se establece el siguiente sistema:

- Si una prueba cualquiera es negativa, se le asigna un valor de 0 (cero) a la prueba.
- Si la primera prueba es positiva, se asigna un valor de 4.
- Si la segunda prueba es positiva, se asigna un valor de 2.
- Si la tercera prueba es positiva, se asigna un valor de 1.

El código numérico se obtiene sumando los valores de las tres pruebas. Los límites inferior y superior del código son 0 y 7 respectivamente.

2. El perfil numérico se introduce en un Software Microgwn Identification System (MID-60) que generara un informe de los cinco microorganismos más parecidos, basados en % de probabilidad. (MICROGEN BIOPRODUCTS. 2004)

2.4.2.7 Determinación de la susceptibilidad a diversos antibióticos

Se utilizó el método de Kirby Bauer de difusión en Agar Mueller Hinton (MH), las placas fueron inoculadas con suspensiones de cada una de las bacterias aisladas ajustando la turbidez a 0,5 McFarland (1.5×10^8 UFC/mL), para lo cual se utilizó un hisopo estéril (FLORES, Mónica et al. 2010, p. 44)

Técnica: para la inoculación se sumergió un hisopo estéril en la suspensión y se eliminó el exceso rotándolo firmemente contra la pared interna del tubo. El hisopo se frotó el sobre la superficie del agar, esta operación se repitió por tres veces sucesivas, rotando la placa para obtener una dispersión uniforme del inóculo en toda la superficie, se dejó secar el inóculo por 5 minutos y se colocaron los discos de antibióticos sobre el agar utilizando pinzas estériles. Las placas se incubaron a 35°C durante 24 horas. (FLORES, Mónica et al. 2010, p. 44)

El criterio utilizado para evaluar la susceptibilidad al antibiótico fue la presencia o ausencia del halo de inhibición, así cuando se observó un halo de inhibición la bacteria fue sensible y en las que no se observó fue resistente. A diferencia de las bacterias patógenas de interés clínico, en las bacterias aisladas del agua evaluamos cualitativamente si han adquirido algún mecanismo de resistencia o susceptibilidad que pueda ser transmitido a otra bacteria que aún no ha desarrollado un mecanismo similar.

Los antibióticos utilizados fueron: Ampicilina (AM) 10mcg; Amoxicilina/ácido clavulánico (AMC) 20/10mcg; Cefalotina (KF) 30mcg; Ceftriaxona (CRO) 30mcg; Oxacilina (OX) 1mcg; Ciprofloxacina (CIP) 5mcg; Eritromicina (E) 15mcg; Gentamicina (CN) 10mcg; Imipenem (IPM) 10mcg; Meropenem (MEN) 10mcg; Penicilina (P) 10U; Trimetoprim/sulfametoxazol (STX) 1.25/23.75 mcg.

2.4.2.8 Detección de metalo β -lactamasas (grupo B)

Se utilizó el método de aproximación de discos en Agar Mueller Hinton (MH), las placas fueron inoculadas con suspensiones de cada una de las bacterias aisladas ajustando la turbidez a 0,5 McFarland (1.5×10^8 UFC/mL), para lo cual se utilizó un hisopo estéril (FLORES, Mónica et al. 2010, p. 44)

En esta determinación se utilizó los carbapenémicos (imipenem IPM 10mcg y meropenem MEN 10mcg), y discos de EDTA (0,5M y pH = 8).

Técnica: para la inoculación se sumergió un hisopo estéril en la suspensión y se eliminó el exceso rotándolo firmemente contra la pared interna del tubo. El hisopo se frotó el sobre la superficie del agar, esta operación se repitió por tres veces sucesivas, rotando la placa para obtener una dispersión uniforme del inóculo en toda la superficie, se dejó secar el inóculo por 5 minutos y luego se colocaron los tres discos teniendo en cuenta de colocar el disco con EDTA en medio de los dos discos de imipenem y meropenem. Las placas se incubaron a 35°C durante 24 horas.

El efecto sinérgico entre los carbapenémicos y el agente quelante (EDTA) es indicativo de la presencia de las enzimas metalo β -lactamasas (GONZALES, E., 2012. p. 4). Se observa un fenotipo característico de metalo β -lactamasas cuando se produce una deformación (aumento) del halo de inhibición en la proximidades del disco de EDTA como se muestra en la figura 6-2 (Navajas, E. 2014. p. 27).

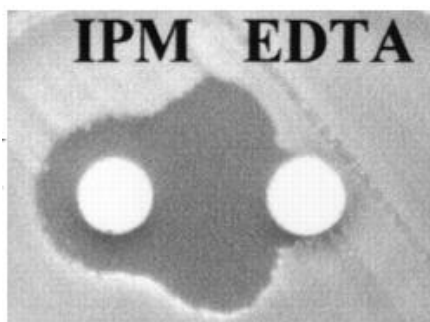


Figura 6-2. Fenotipo de producción de metalo β -lactamasas.
Fuente: Navajas, E. 2014. p. 27

Preparación de discos con EDTA (0.5 M): se procedió a pesar 0.75 gramos de EDTA y disolverla en 4 mL de agua destilada, para disolverla por completa se lleva la mezcla a pH alcalino para posteriormente esterilizarla. Luego se adicionó 100 μ L de la solución a los discos “blanco” es decir los que no contienen ningún antibiótico, los discos se almacenaron en refrigeración a temperatura entre 4 -8 °C.

2.4.2.9 Determinación de la actividad antimicrobiana.

Se utilizó el método de difusión en Agar Mueller Hinton (MH), las placas fueron inoculadas con suspensiones de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 y *Staphylococcus aureus* ATCC25923 ajustando la turbidez a 0,5 McFarland (1.5×10^8 UFC/mL), para lo cual se utilizó un hisopo estéril (FLORES, Mónica et al. 2010, p. 44)

Para esta determinación las dos cepas monitor fueron proporcionadas por el laboratorio de Análisis Bioquímicos y Bacteriológicos de la Facultad de Ciencias de la ESPCOH.

Técnica: para la inoculación de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 y *Staphylococcus aureus* ATCC25923 se sumergió un hisopo estéril en la suspensión y se eliminó el exceso rotándolo firmemente contra la pared interna del tubo.

El hisopo se frotó sobre la superficie del agar, esta operación se repitió por tres veces sucesivas, rotando la placa para obtener una dispersión uniforme del inóculo en toda la superficie, se dejó secar el inóculo por 5 minutos y luego se inoculó las cepas aisladas de agua termal por punción con un palillo de madera estéril y se incubaron a 35°C por 24 horas.

La actividad antibacteriana fue determinada según el diámetro del halo de inhibición formado alrededor de las colonias aisladas del agua. Según Pérez, G., et al (1999) los halos de inhibición > 0,1cm, revelan producción de sustancias antibacterianas.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Parámetros fisicoquímicos y características generales de las aguas termales del balneario Urauco.

Se determinó la temperatura del agua en cada uno de los puntos recolectados, en el manantial se registró una temperatura de 25.9°C y en la piscina la temperatura fue de 33.5°C, mientras que la temperatura ambiental fue de 16.5°C, tal como se detalla en la tabla 1-3; por otra parte la diferencia entre las temperaturas del agua con respecto a la del ambiente fue 9,4°C para el manantial y 17°C para la piscina, de esta manera se demostró que las aguas del balneario Urauco son termales ya que tienen una diferencia sobre los 5°C con respecto a la temperatura del ambiente.

Con respecto a los valores de conductividad y sólidos totales disueltos en el manantial se registró 1990µS/cm, 991ppm respectivamente, mientras que en la piscina estos valores se encontraban más elevados registrándose 3134µS/cm de conductividad y 1565ppm de Sólidos totales disueltos, según se muestra en la tabla 1-3.

Tabla 1-3. Parámetros físico-químicos y características generales de las aguas termales del balneario Urauco.

Parámetro	Manantial	INAMHI	Piscina	INAMHI
Temperatura del agua (°C)	25.9	34,10	33.5	35,70
Temperatura ambiente (°C)	16.5	---	16.5	---
Conductividad (µS/cm)	1990	2440	3134	3440
Sólidos totales disueltos STD (ppm)	991	1578,68	1565	2225,68

REALIZADO POR: GUAILLA R. 2015

Las aguas termales del balneario Urauco presentaron diferentes temperaturas en cada punto donde se recolectaron las muestras tal como se detalla en la tabla 1-3, el manantial está 7.6°C por debajo de la temperatura de la piscina, esta diferencia pudo deberse a que el agua de la piscina fue recolectada en la naciente del afluente, a diferencia del manantial donde la muestra recolectada tenía más contacto con la superficie y no fue del punto de emergencia lo que influyó que tuviera menor temperatura.

Al comparar los valores de temperatura reportados por el INAMHI para las aguas del balneario Urauco con los valores registrados en este trabajo, en la tabla 1-3 se puede observar que el manantial tiene menor temperatura (25.9°C) que la registrada por el INAMHI (34.1°C), mientras que la piscina (33.5°C) tiene una temperatura casi similar (35.7°C), estas variaciones están relacionadas a la época del año, tipo de equipo utilizado en la medición, así como también tiempo transcurrido desde la medición realizada por el INAMHI hasta la presente investigación.

Los mismos factores que influyeron en la diferencia de temperatura también pudieron influir en la cantidad de sólidos totales disueltos y conductividad registrados en la tabla 1-3, el agua del manantial al tener una mayor área de contacto con el suelo las partículas en suspensión pueden reaccionar y no ser detectados por el equipo, a diferencia del agua de la piscina que no tiene mayor contacto, ni tiempo de reaccionar con otras sustancias ya que se analizó directamente en el punto de surgencia.

Según el INAMHI en el manantial se registró 1578,68ppm de sólidos totales disueltos, conductividad de 2240µS/cm, mientras que en este trabajo se reportó 991ppm y 1990µS/cm respectivamente y en la piscina el INAMHI reportó 2225,68ppm de sólidos totales disueltos, y 3440µS/cm de conductividad, mientras que en este trabajo se encontró 1565ppm y 3134µS/cm respectivamente, estas diferencias pueden estar relacionadas con la variación de iones en el tiempo.

En relación a los resultados organolépticos el olor no fue desagradable, el color característico predominante fue verdoso cristalino en la piscina y en el manantial este color verdoso es más intenso con aspecto turbio.

3.2 Análisis microbiológico de las aguas termales del balneario Urauco.

3.2.1 Bacterias Aerobias Mesófilas

Se reportó que la cantidad de bacterias aerobias mesófilas en el manantial fue de 7.3×10^2 UFC/mL, mientras que en la piscina estas bacterias se encontraron en menor cantidad reportándose un valor de 3.3×10^2 UFC/mL, al promediar los datos anteriores se registró que el total de bacterias aerobias mesófilas en el balneario Urauco fue de 5.3×10^2 UFC/mL, tal como se detalla en la tabla 2-3.

Tabla 2-3. Número de bacterias aerobias mesófilas (UFC/mL)

Procedencia	R ₁	R ₂	\bar{X}	σ	σ^2
Manantial	7.4×10^2	7.2×10^2	7.3×10^2	14.14	200
Piscina	3.8×10^2	2.8×10^2	3.3×10^2	70.71	5000
Total bacterias en el balneario =			5.3×10^2 UFC/mL		
Desviación estándar (σ) del balneario =			234.66		
Varianza (σ^2) del balneario =			55066.67		
R ₁ : réplica uno					
R ₂ : réplica dos					

REALIZADO POR: GUAILLA R. 2015

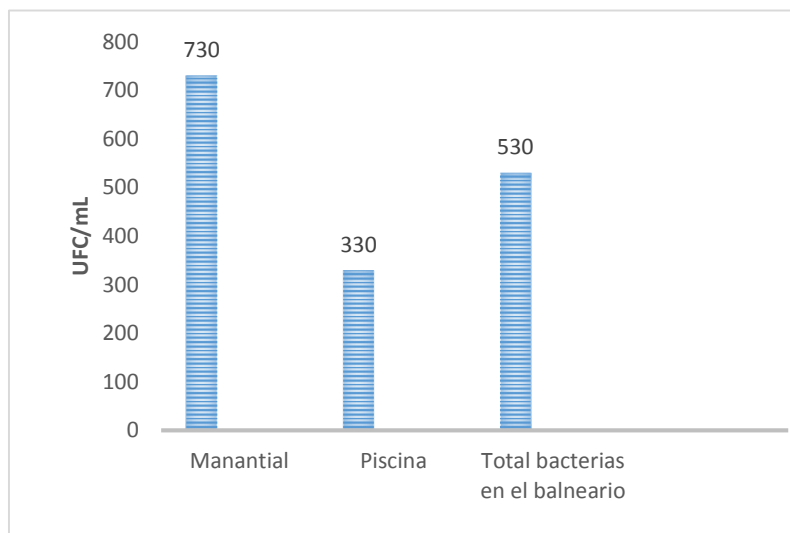


Gráfico 1-3. Bacterias aerobias mesófilas

REALIZADO POR: GUAILLA R. 2015

Los ambientes termales presentan microorganismos adaptados a las condiciones adversas de temperatura. Así, los dos puntos analizados en el balneario Urauco presentan una alta diversidad biológica pero con diferencias significativas en cada punto analizado. Al observar la tabla 2-3 la diferencia de bacterias aerobias mesófilas entre el manantial (7.3×10^2 UFC/mL) y la piscina (3.3×10^2 UFC/mL) es de 4×10^2 UFC/mL esta diferencia se pudo deber a la ubicación y características de cada punto de recolección de las muestras, en el caso del manantial el agua estaba acumulada y tenía contacto directo con el suelo, a diferencia de la piscina donde la muestra se recolectó del punto de surgencia y la temperatura del agua fue más alta lo que pudo inhibir parte de la microbiota.

La cantidad total de bacterias aerobias mesófilas registradas en el balneario Urauco fue de 5.3×10^2 UFC/mL, este valor difiere de lo reportado por De La Rosa, M^a, et al, en el 2009., en el balneario Alicún de las Torres donde se reportó que la cantidad de bacterias heterótrofas aerobias viables fue menor a 100 UFC/mL, esta diferencia se puede deber a la distinta composición mineral del agua, variación de los métodos de recuento, y forma de recolección de las muestras.

La cantidad de bacterias aerobias mesófilas reportados en el balneario Urauco difiere aún más con respecto al balneario Puente Viesgo, donde se encontró que el número de bacterias heterótrofas aerobias viables fue menor a 10 UFC/mL según De La Rosa, M^a, et al, en el 2007, de igual manera existe una diferencia notoria con el balneario Baños de la Concepción donde el número de bacterias heterótrofas aerobias viables fue menor a 20 UFC/mL según lo reportado por Mosso., M^a y De La Rosa, M^a, en el 2011.

Según el boletín oficial de Canarias N° 38, de 1989 orden que regula el régimen técnico sanitario de piscinas, se establece que la cantidad de bacterias aerobias totales debe ser menor a 200 UFC/mL, en cuyo caso el balneario Urauco estaría en el límite permitido, la diferencia es que el balneario Urauco no solo está formado por una piscina sino también por un manantial natural y ninguna normativa ha establecido hasta el momento un límite de bacterias aerobias mesófilas para manantiales naturales y piscinas termales.

3.2.2 *E. coli/Coliformes*

El recuento de coliformes totales en el manantial fue de 10 UFC/mL y en la piscina se registró 93 UFC/mL, a diferencia del recuento de *E. coli* que registró valores más bajos en la piscina, donde se reportó se reportó 1 UFC/mL y en el manantial el recuento fue de 3 UFC/mL. Al final del análisis el total de coliformes en el balneario Urauco fue de 52 UFC/mL, mientras que el total de *E. coli* fue de 2 UFC/mL, tal como se detalla a continuación en la tabla 3-3 y gráfico 2-3.

Tabla 3-3. Número de bacterias *E. coli*/Coliformes (UFC/mL)

Procedencia	<i>Coliformes totales</i>					<i>Escherichia coli</i>				
	R ₁	R ₂	\bar{X}	Σ	σ^2	R ₁	R ₂	\bar{X}	σ	σ^2
Manantial	14	5	10	6.36	40.5	3	2	3	0.70	0.5
Piscina	94	91	93	2.12	4.5	1	1	1	0	0
Total bacterias en el balneario:										
<i>Coliformes totales</i> = 52 UFC/mL <i>E. coli</i> = 2 UFC/mL										
Desviación estándar (σ) del balneario:										
Coliformes totales = 48.08 <i>E. coli</i> = 0.96										
Varianza (σ^2) del balneario:										
Coliformes totales = 2311.33 <i>E. coli</i> = 0.92										
R ₁ : réplica uno										
R ₂ : réplica dos										

REALIZADO POR: GUAILLA R. 2015

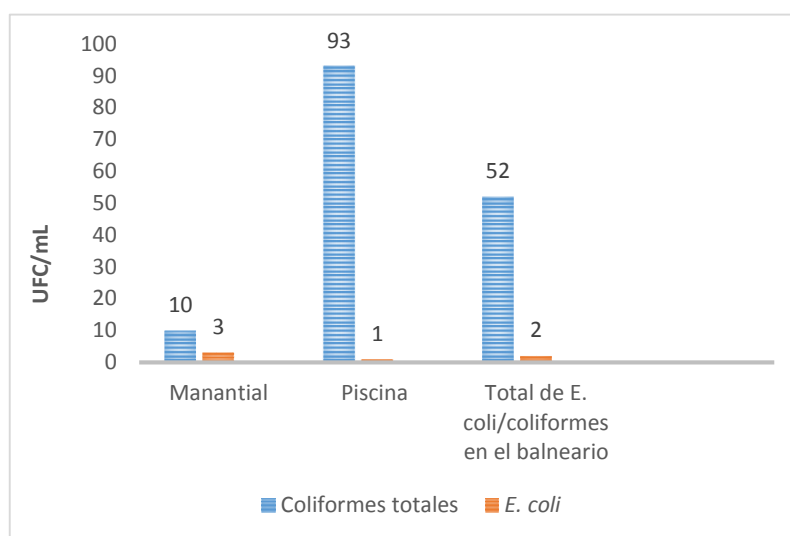


Gráfico 2-3. *E. coli*/Coliformes totales

REALIZADO POR: GUAILLA R. 2015

En la piscina se registró mayor cantidad de coliformes totales (93 UFC/mL) en relación al manantial (10 UFC/mL), la causa principal se pudo deber a que en ambos sitios al emerger el agua esta entra en contacto directo con el suelo y permanece expuesta al ambiente, las mismas razones se aplican para la presencia de *E. coli*, que en manantial el recuento fue de 3 UFC/mL y en la piscina se reportó 1 UFC/mL según la tabla 3-3, estos microorganismo pueden provenir de las aguas de los alrededores de los puntos de recolección de las muestras, ya que se trata de una zona con alta humedad y gran número de vertientes, y al existir infiltraciones en el suelo el agua

contaminada puede mezclarse con el agua de las fuentes termales, sin descartar que parte de estos microorganismos pueden ser aportados por los bañistas.

La presencia de coliformes totales y fecales en el balneario Urauco también pudo estar relacionada con la ubicuidad de algunos géneros que conforman este grupo de indicadores, pues se adaptan a las condiciones del ambiente por lo que es común encontrarlos en el agua, es así que estos microorganismos han sido reportados por Vendrell, M. C., et al, en 1998 en las inmediaciones de la fuente termal de Tinteiro.

Mora, D., en 1996 analizó la calidad de las aguas dulces utilizadas para recreación (natación), y estableció que la cantidad de *E. coli* en este tipo de aguas debe ser menor a 200 UFC/100mL, los resultados obtenidos en el balneario Urauco indican que se encontró 100UFC/100mL de *E. coli* en la piscina lo que expresa un criterio microbiológico aceptable, no así el manantial donde el número de *E. coli* fue 300UFC/100mL, este valor estaría 100UFC/100mL por encima del límite permisible en este tipo de aguas utilizadas principalmente para recreación.

No obstante, De la Rosa, M^a., et al en el 2009 no reportan la presencia de estos microorganismos en el balneario Alicún de las Torres, tampoco están presentes en el balneario Puente Viesgo (2007), al igual que Mosso, M^a., et al, en el 2011, no encontraron estos microorganismo en el balneario Baños de la Concepción, todas estas fuentes mencionadas registraron similares condiciones de temperatura a las reportadas por nosotros para las aguas del balneario Urauco.

3.2.3 *Staphylococcus aureus*

En la presente investigación no se encontró *S. aureus*, los resultados se detallan a continuación en la tabla 4-3:

Tabla 4-3. Número de bacterias *S. aureus* (UFC/mL)

Procedencia	R ₁ /color de las colonias			R ₂ /color de las colonias		
	rojo-violeta	Negras	azul - verde	rojo-violeta	negras	azul - verde
Manantial	0	1	1	0	0	1
Piscina	0	7	9	0	4	8

R₁: réplica uno
R₂: réplica dos
Colonias rojo-violeta: *S. aureus*
Colonias negras: puede ser o no *S. aureus*
Colonias azul-verde: no son *S. aureus*.

REALIZADO POR: GUAILLA R. 2015

Según lo reportado en la tabla 4-3, no se encontró *S. aureus* en ninguno de los puntos analizados en el balneario de aguas termales Urauco, las colonias de color negro que pueden ser *S. aureus* se descartarán luego de utilizar el disco Petrifilm Staph Express como prueba confirmatoria, estos resultados concuerdan con los reportados por De la Rosa, M^a., et al, en el 2009 en el balneario de Alicún de las Torres y, Puente Viesgo en 2007, al igual que Mosso, M^a., et al, en 2011 en el balneario Baños de la Concepción.

Sin embargo en los balnearios anteriormente mencionados se reportaron otras especies del género *Staphylococcus*, y se demostró que estos microorganismos forman parte de la microbiota de las aguas termales.

Otras fuentes como la de Tinteiro, estudiada por Vendrell, M. C., et al, en 1998, registraron la presencia de *Staphylococcus aureus* en las inmediaciones de la fuente termal.

En 1996 Mora, D., estableció que la cantidad de *Staphylococcus aureus* para las aguas dulces utilizadas en recreación (natación) debe ser menor a 100UFC/100mL. En el caso del balneario Urauco se demuestra que está dentro de todos los límites establecidos en otros estudios.

3.2.4 Mohos y levaduras

En el presente estudio se encontró que la cantidad de mohos fue menor con respecto a la de levaduras, en el manantial el recuento de mohos fue de 1 UFC/mL, y de levaduras 6 UFC/mL. En la piscina no se encontró mohos pero se reportó 63 UFC/mL de levaduras, tal como se detallan en la tabla 5-3 y figura 3-3.

Tabla 5-3. Número de mohos y levaduras (UFC/mL)

Procedencia	Mohos		Mohos			Levaduras		Levaduras		
	R ₁	R ₂	\bar{X}	Σ	σ^2	R ₁	R ₂	\bar{X}	σ	σ^2
Manantial	1	0	1	0.7	0.5	7	4	6	2.12	4.5
Piscina	0	0	0	0	0	76	50	63	18.4	338
Total hongos en el balneario:										
<i>Mohos</i> = 1 UFC/mL					<i>Levaduras</i> = 35 UFC/mL					
Desviación estándar (σ) del balneario:										
<i>Mohos</i> = 0.5 UFC/mL					<i>Levaduras</i> = 1216.25 UFC/mL					
Varianza (σ^2) del balneario:										
<i>Mohos</i> = 0.25 UFC/mL					<i>Levaduras</i> = 34.87 UFC/mL					
R ₁ : réplica uno										
R ₂ : réplica dos										

REALIZADO POR: GUAILLA R. 2015

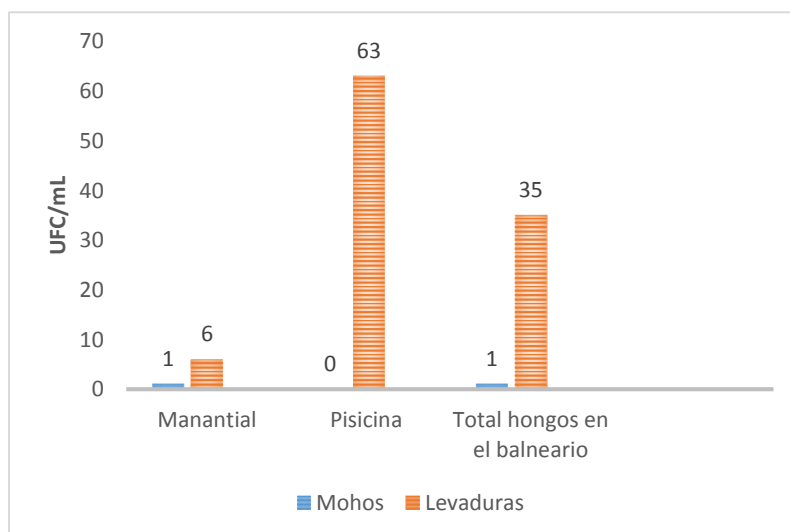


Gráfico 3-3. Mohos y levaduras

REALIZADO POR: GUAILLA R. 2015

En el balneario Urauco la cantidad de mohos (1 UFC/mL) no es importante en relación a la cantidad de levaduras especialmente las reportadas en la piscina donde se registraron 63 UFC/mL y 6 UFC/mL en el manantial (tabla 5-3), suponemos que en la piscina las levaduras encontradas

proviene de ambientes externos como de las aguas de infiltración, o bien la mayoría de estos microorganismos pueden ser parte de la microbiota autóctona ya que pueden adaptarse a las condiciones de este tipo de hábitats debido a que son muy ubicuos.

De La Rosa, M^a., et al, en el 2004, encontraron 2 UFC/100mL de levaduras en los manantiales del balneario La Virgen y una cantidad menor a 10 UFC/100mL de hongos filamentosos en los balnearios de la localidad de Jaraba. En este sentido con respecto a los hongos filamentosos el balneario Urauco presentó un valor 10 veces mayor (tabla 5-3), al reportado por De La Rosa, M^a., et al (2004), en nuestro caso no realizamos una identificación de los hongos aislados por lo que no podemos afirmar que son patógenos.

Según lo reportado por De La Rosa, M^a., et al, en 2009, en el manantial “Baños de Abajo” del Balneario Alicún de la Torres el recuento de hongos fue de 600 UFC/100mL, y los géneros encontrados fueron *Penicillium*, *Fusarium* y *Alternaria* que corresponden a hongos filamentosos, la cantidad de hongos reportada en este balneario no afectó a la calidad sanitaria, y en nuestro caso el recuento de mohos es menor que el reportado de manera que tampoco influye en la calidad sanitaria.

Las levaduras en ambientes acuáticos fueron registradas anteriormente por Russo, G., et al, en 2006, en Río Agrio y Lago Caviahue, un ambiente acuático ácido de origen volcánico (Neuquén, Argentina), donde se encontraron levaduras en concentraciones variables entre 25-1192 UFC/L, registrándose cinco géneros distintos *Candida*, *Cryptococcus*, *Cystofilobasidium*, *Rhodotorula* y *Sporobolomyces*.

En el 2011 Fernández, R y Smits, G, identificaron 42 especies de hongos acuáticos del grupo hifomicetos, provenientes de la cabecera del río Guárico del estado de Carabobo, Venezuela, hongos importantes desde el punto de vista ecológico y biotecnológico, por lo que un ambiente con gran diversidad biológica como el balneario de aguas termales Urauco puede ser reservorio de especies con gran potencial industrial que deberán ser aislados, identificados y sometidos a estudios.

3.2.5 Resumen del recuento de microorganismos indicadores analizados en el balneario de aguas termales Urauco.

En el balneario de aguas termales Urauco se encontraron 5.3×10^2 UFC/mL de bacterias aerobias mesófilas, en cuanto a *E. coli* se registraron un total de 2 UFC/mL registrándose una mayor cantidad de estos microorganismos indicadores en el manantial; mientras que el total de bacterias

pertenecientes al grupo coliforme fue de 52 UFC/mL, y el recuento de levaduras fue de 35 UFC/mL, estos dos grupos de microorganismos fueron encontrados en mayor cantidad en la piscina con respecto al manantial. El recuento de mohos en el balneario fue de 1 UFC/mL y no se encontró *S. aureus* (tabla 6-3 y gráfico 4-3).

Tabla 6-3. Resumen del recuento de microorganismos (UFC/mL) en las aguas termales del balneario Urauco, Lloa.

Procedencia	Aerobios mesófilos	Coliformes totales	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	Mohos	Levaduras
Manantial	7.3x10 ²	10	3	0	1	6
Piscina	3.3x10 ²	93	1	0	0	63
Total microorganismos en el balneario	5.3x10²	52	2	0	1	35

REALIZADO POR: GUAILLA R. 2015

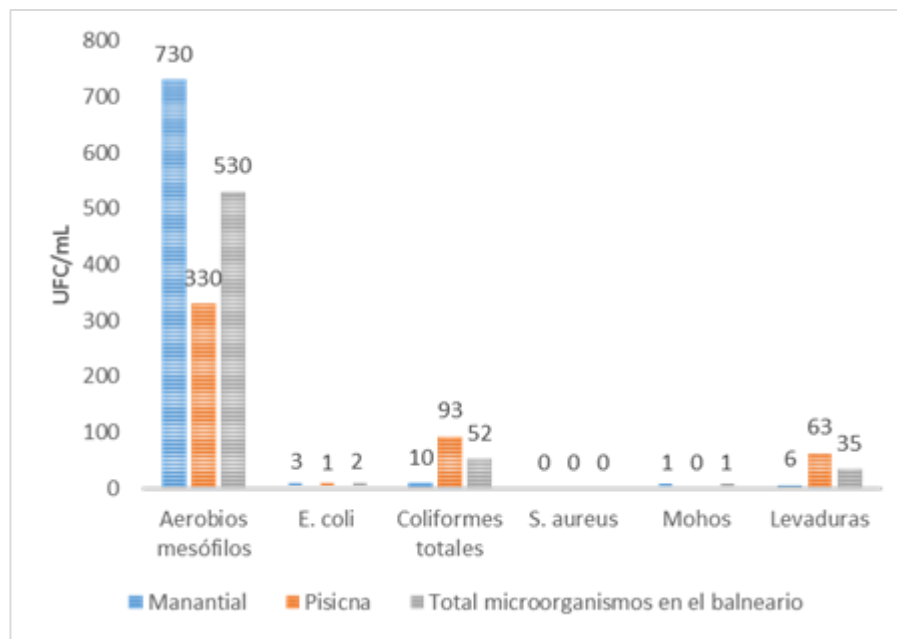


Gráfico 4-3. Microorganismos encontrados en las aguas termales de balneario Urauco

REALIZADO POR: GUAILLA R. 2015

3.2.6 Caracterización microscópica de las colonias aisladas en las aguas termales del balneario Urauco.

Entre los dos puntos de muestreo (manantial y piscina) se seleccionaron un total 45 colonias provenientes de los Petrifilm de aerobios mesófilos, *E. Coli*/coliformes y Staph express.

En la tabla 7-3, se detalla que del manantial se aislaron 21 colonias, de las cuales 8 proceden del Petrifilm de aerobios mesófilos, 10 del Petrifilm de *E. Coli*/coliformes y 3 del Petrifilm Staph express. En la tabla 8-3, se detalla que de la piscina se aislaron 24 colonias de las cuales 7 proceden del Petrifilm de aerobios mesófilos, 9 del Petrifilm de *E. Coli*/coliformes y 8 del Petrifilm Staph express.

Luego de repicar las 45 colonias seleccionadas por cuatro veces se lograron estabilizar solo 36 aislados, las 9 colonias restantes no sobrevivieron hasta el último repique, en el manantial las 2 colonias que no sobrevivieron procedían del Petrifilm de aerobios mesófilos, tal como se observa en la tabla 7-3, mientras que en la piscina no sobrevivieron 7 colonias procedentes del Petrifilm Staph express según se detalla en la tabla 8-3.

De las 36 colonias estabilizadas, 19 procedían del manantial y 17 de la piscina, estas colonias fueron posteriormente resembradas por agotamiento para tratar de obtener clones puros, en este sentido se logró obtener 14 clones puros evidenciados microscópicamente con la ayuda de la coloración Gram, por su condición de puros estos 14 clones fueron procesados para su identificación.

Los 22 clones restantes que no se lograron purificar presentaban la característica de ser cultivos mixtos, observándose microscópicamente con la ayuda de la tinción Gram más de un tipo formológico, es decir estaban formadas por bacilos Gram - y Gram +, cocos Gram +, hifas y otros artefactos por lo que no se las tomo en cuenta para identificarlos (tabla 7-3) y (tabla 8-3).

Tabla 7-3. Identificación y caracterización microscópica de los clones aislados del manantial

Sitio	Código del aislado	Petrifilm Aerobios	Código del aislado	Petrifilm <i>E. coli</i> /coliformes	Código del aislado	Petrifilm Staph Express	Total colonias	
							Aisladas	Estabilizadas
Manantial	1	Bacilos Gram negativos Hifas	1	Bacilos Gram negativos Cocos Gram positivos	1	Bacilos Gram negativos Bacilos Gram positivos	21	19
	2	Sin crecimiento en el cuarto repique	3	Bacilos Gram negativos Hifas	3	Bacilos Gram negativos		
	3	Bacilos Gram negativos Hifas	5	Bacilos Gram negativos Hifas	5	Cocos Gram positivos Bacilos Gram negativos		
	4	Bacilos Gram negativos	7	Bacilos Gram negativos				
	5	Bacilos Gram negativos	9	Bacilos Gram negativos				
	6	Sin crecimiento en el cuarto repique	11	Bacilos Gram negativos Hifas				
	7	Bacilos Gram negativos	13	Bacilos Gram negativos Bacilos Gram positivos				
	8	Bacilos Gram negativos Cocobacilos Gram negativos	15	Bacilos Gram negativos				
			17	Bacilos Gram negativos Bacilos Gram positivos				
		19	Bacilos Gram negativos Hifas					

REALIZADO POR: GUAILLA R. 2015

Tabla 8-3. Identificación y caracterización microscópica de los clones aislados de la piscina

Sitio	Código del aislado	Petrifilm Aerobios	Código del aislado	Petrifilm <i>E. coli</i> /coliformes	Código del aislado	Petrifilm Staph Express	Total colonias	
							Aisladas	Estabilizadas
Piscina	9	Bacilos Gram positivos	16	Bacilos Gram negativos	7	Sin crecimiento en el cuarto repique	24	17
	10	Bacilos Gram negativos	17	Bacilos Gram negativos	9	Bacilos Gram negativos Bacilos Gram positivos		
	11	Bacilos Gram negativos	18	Bacilos Gram negativos	11	Sin crecimiento en el segundo repique		
	12	Bacilos Gram negativos Hifas	20	Bacilos Gram negativos Bacilos Gram positivos Hifas	13	Sin crecimiento en el cuarto repique		
	13	Bacilos Gram negativos Hifas	21	Bacilos Gram positivos Hifas	15	Sin crecimiento en el cuarto repique		
	14	Bacilos Gram negativos Hifas	22	Bacilos Gram negativos Bacilos Gram positivo	16	Sin crecimiento en el segundo repique		
	15	Bacilos Gram negativos	23	Bacilos Gram negativos Bacilos Gram positivos Hifas	19	Sin crecimiento en el segundo repique		
			25	Bacilos Gram negativos Hifas	21	Sin crecimiento en el tercer repique		
			26	Bacilos Gram negativos Hifas				

REALIZADO POR: GUAILLA R. 2015

3.2.7 Morfología y tinción Gram de los clones puros aislados a partir de las aguas termales del balneario Urauco.

A cada uno de los 14 clones aislados se les realizó una segunda tinción Gram para observar la morfología microscópica y confirmar la pureza de los mismos, de esta manera se los clasificó como bacterias Gram positivas o Gram negativas.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 9-3, donde se observa que los siete clones aislados del manantial corresponden a bacilos Gram negativos (100%), mientras que de los siete clones aislados en la piscina, seis (85.7%) corresponden a bacilos Gram negativos y uno (14.3%) es bacilo Gram positivo. Del total de clones puros aislados en el balneario el 100% son bacilos, de las cuales trece (92.29%) son Gram negativos y tan solo uno (7.1%) es Gram positivo (gráfico 5-3).

Tabla 9-3. Morfología y tinción Gram de los clones puros.

Sitio	Código del aislado puro	Petrifilm de origen (código del aislado)	Tinción	Morfología	Total		Porcentaje (%)	
					Bacilos Gram -	Bacilos Gram +	Bacilos Gram -	Bacilos Gram +
Manantial	2	Petrifilm aerobios (4)	Gram -	Bacilos	7	0	100	0
	3	Petrifilm aerobios (5)	Gram -	Bacilos				
	4	Petrifilm aerobios (7)	Gram -	Bacilos				
	6	Petrifilm E. coli/coliformes (15)	Gram -	Bacilos				
	9	Petrifilm E. coli/coliformes (7)	Gram -	Bacilos				
	10	Petrifilm E. coli/coliformes (9)	Gram -	Bacilos				
	26	Petrifilm Staph express (3)	Gram -	Bacilos				
Piscina	5	Petrifilm aerobios (11)	Gram -	Bacilos	6	1	85.7	14.3
	7	Petrifilm E. coli/coliformes (17)	Gram -	Bacilos				
	12	Petrifilm aerobios (9)	Gram +	Bacilos				
	13	Petrifilm aerobios (10)	Gram -	Bacilos				
	14	Petrifilm aerobios (15)	Gram -	Bacilos				
	15.1	Petrifilm E. coli/coliformes (16)	Gram -	Bacilos				
	15.2	Petrifilm E. coli/coliformes (18)	Gram -	Bacilos				
Total de aislados bacterianos puros encontrados en el presente estudio					13	1	92.9	7.1

REALIZADO POR: GUAILLA R. 2015

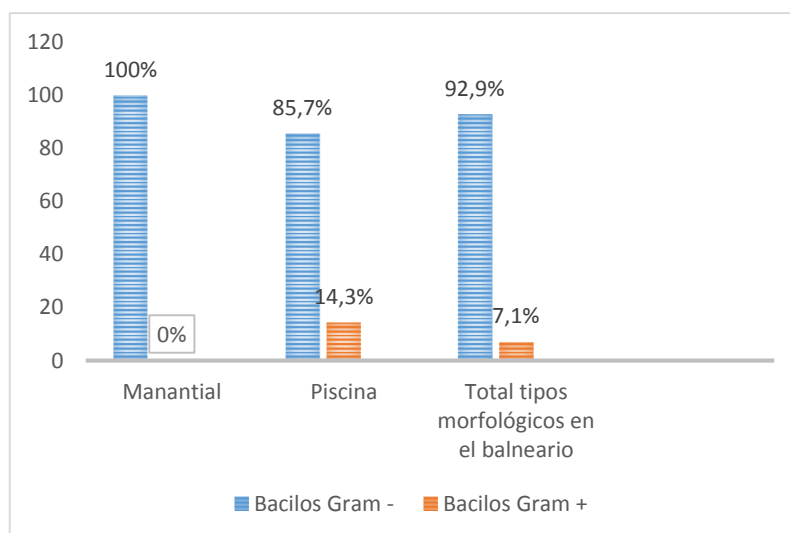


Gráfico 5-3. Diversidad de tipos morfológicos (% cepas)
REALIZADO POR: GUAILLA R. 2015

Es importante indicar que aunque todos los clones puros son bacilos (tabla 9-3), esta no es la composición real del balneario porque entre los aislados no purificados (tabla 7-3) se reportaron 3 clones (clones 8, 5 y 1) donde se observaron cocos y cocobacilos.

Según Flores, S., en el 2011, luego de estudiar el manantial termal de Santa Apolonia, Mérida registro 9 bacterias aisladas, de las cuales 8 (88.88%) son Gram negativas y 1 (11.11%) fue Gram positiva, similares resultados obtuvo en el manantial termal de La Mitisús, Mérida donde aisló 12 bacterias siendo 10 (83.33%) Gram negativas y 2 (16.66%) Gram positivas, estos resultados son similares a los obtenidos en el presente estudio.

De La Rosa, M^a., et al, en el 2007 reportaron para el balneario Puente Viesgo un 62.2% de bacilos Gram negativos y, que el segundo tipo morfológico más abundante fueron los bacilos Gram positivos con un 18.9%; De La Rosa, M^a., et al, en el 2009, al estudiar el balneario Alicún de las Torres reportaron un mayor porcentaje de bacilos Gram negativos los mismos que corresponden al 54.5% y los bacilos Gram positivos corresponden al 29.1%.

Mosso, M^a., et al, en el 2011, reportaron que el balneario Baños de la Concepción tiene 60% de bacilos Gram negativos y el 29.6% de bacilos Gram positivos. En todos los bañeros anteriormente descritos es evidente que predominaron los bacilos Gram negativos al igual que en el balneario de aguas termales Urauco.

A los 14 clones puros aisladas en el balneario de aguas termales de Urauco también se procedió a realizar una descripción en base a las principales características morfológicas de las colonias (tabla 10-3), observándose que la forma predominante fue la circular, los clones con borde entero fueron encontradas con mayor frecuencia, la mayoría de las cepas tenían una evidente elevación así como una superficie lisa brillante, y consistencia cremosa.

Otros parámetros demostraron que el color predominante de los clones fue el crema – blanco hueso, con una consistencia cremosa y en cuanto la característica óptica predominante fue la translúcida. El tamaño fue variable pero ninguna cepa supero los 4mm de diámetro antes de las 24 horas de incubación.

Tabla 10-3. Características morfológicas de los clones puros

Sitio	Código clones	Forma	Borde	Elevación	Superficie	Consistencia	Color	Luz transmitida	Tamaño (mm)
Manantial	2	Circular	Entero	Plano	Liso – brillante	Cremosa	Crema – blanco hueso	Opaca	2
	3	Irregular	Entero	Elevado	Liso – brillante	Cremosa	Crema – blanco hueso	Translucido	1
	4	Circular	Entero	Plano	Liso – brillante	Cremosa	Crema	Opaca	3
	6	Circular	Entero	Ligeramente elevado	Liso – brillante	Cremosa	Crema	Opaca	2
	9	Irregular	Ondulado	Elevado	Liso – brillante	Cremosa	Crema	Translucido	2
	10	Irregular	Lobulado	Ligeramente elevado	Liso – brillante	Cremosa	Crema – blanco hueso	Translucido	4
	26	Circular	Rizada	Plano	Erizada – pulverulenta	Cremosa	Crema – blanco hueso	Translucido	4
Piscina	5	Circular	Entero	Ligeramente elevado	Liso – brillante	Cremoso	Crema – blanco hueso	Opaca	4
	12	Circular	Entero	Elevado	Liso – brillante	Cremoso	Crema – blanco hueso	Opaca	3
	13	Circular	Entero	Elevado	Liso – brillante	Cremoso	Crema – blanco hueso	Translucido	3
	14	Circular	Entero	Elevado	Liso – brillante	Cremoso	Crema – blanco hueso	Translucido	2
	15.1	Irregular	Entero	Elevado	Liso – brillante	Cremoso	Crema – blanco hueso	Translucido	3
	15.2	Irregular	Rizada	Plano	Liso – brillante	Cremoso	Crema – blanco hueso	Translucido	3
	7	Circular	Entero	Elevado	Rugosa	Mucoso	Anaranjado –leve	Translucido	1

REALIZADO POR: GUAILLA R.2015

3.2.8 Identificación de Géneros y especies de las bacterias aisladas en las aguas termales del balneario Urauco

En el manantial se encontraron siete géneros distintos de los cuales cuatro se determinaron por medio de las pruebas bioquímicas y corresponden a los siguientes microorganismos: *Acidovorax delafieldii*, *Aeromonas salmonicidas sup. salmonicida*, *Citrobacter freundii*, *Brevundimonas diminuta* (tabla 11-3). Los otros tres géneros encontrados se identificaron mediante el sistema Microgen GNA + B Oxidasa positivo y corresponden a los siguientes microorganismos: *Pasteurella multocida*, *Flavobacterium odoratum*, *Vibrio alginolyticus* (tabla 12-3).

En la piscina se lograron identificar cinco clones, los microorganismos encontrados corresponden a tres géneros distintos los mismos que fueron identificados utilizando pruebas bioquímicas, tres clones corresponden a *Aeromonas caviae*, una a *Budvicia aquatica*, y el bacilo Gram positivo corresponde al género *Bacillus spp* (tabla 11-3).

Tabla 11-3. Pruebas bioquímicas y microorganismo identificados en el balneario de aguas termales Urauco

Sitio	Código de clones	Pruebas bioquímicas													Crecimiento		Porcentaje de coincidencia de las pruebas	Microorganismos identificados
		Catalasa	Oxidasa	O/F de la glucosa	KLIGLER			SIM			Urea	Citrato	Licuefacción de gelatina	Hidrolisis de Almidón	Agar MacConkey	Agar manitol		
					Lactosa/Glucosa (Pico/Fondo)	Gas	H ₂ S	P. sulfuros	P. indol	Motilidad								
Manantial	2	-	+	O/F	A/A	+	-	-	+	+	-	-	ND	ND	G	NG	80%	<i>Acidovorax delafieldii</i>
	3	+	+	O/F	Alc/A	+	-	+	-	+	-	-	ND	ND	G	NG	87.5%	<i>Aeromonas salmonicidas</i> sup. <i>salmonicida</i>
	4	+	+	O/F	Alc/A	+	-	-	+	+	-	-	ND	ND	G	NG	ND	Determinado por Microgen GNA + B
	6	+	-	O/F	A/A	+	-	-	-	+	-	+	ND	ND	G	NG	90%	<i>Citrobacter freundii</i>
	9	-	+	I	Alc/A	-	-	-	+	+	-	-	ND	ND	G	NG	85.7%	<i>Brevundimonas diminuta</i>
	10	-	+	I	Alc/Alc	-	-	-	-	-	+	+	ND	ND	G	NG	ND	Determinado por Microgen GNA + B
Piscina	26	-	+	I	Alc/Alc	-	-	-	-	-	-	+	ND	ND	G	NG	ND	Determinado por Microgen GNA + B
	5	+	+	O/F	Alc/A	+	-	+	-	+	+	+	ND	ND	G	NG	81.8%	<i>Aeromonas caviae</i>
	7	+	-	O/F	Alc/A	-	-	+	-	+	+	+	ND	ND	G	NG	88.9%	<i>Budvicia aquatica</i>
	12	+	+	O/F	Alc/A	-	-	+	-	+	+	-	-	+	NG	NG	72.7%	<i>Bacillus spp.</i>
	13	+	+	O/F	Alc/A	+	-	-	+	+	-	-	ND	ND	G	NG	99.5%	<i>Aeromonas caviae</i>
	14	+	+	O/F	Alc/A	+	-	-	+	+	-	-	ND	ND	G	NG	99.5%	<i>Aeromonas caviae</i>

G: crecimiento; NG: no hay crecimiento; A: acido (amarillo); Alc: alcalino (rojo); O: oxidativo; F: fermentativo; I: inerte; ND: no determinado

REALIZADO POR: GUAILLA, R. 2015

Tabla 12-3. Resultados del sistema “Microgen GNA + B Oxidasa positivo” para los clones 4,10 y 26 aislados del manantial.

Pruebas	Código de Clones		
	4	10	26
Oxidasa	+	+	+
Movilidad	+	-	-
Reducción de nitrato	-	-	+
Lisina decarboxilasa	-	-	-
Ornitina decarboxilasa	-	-	+
Producción de H ₂ S	-	-	+
Fermentación de la glucosa	+	-	-
Fermentación de manitol	+	-	-
Fermentación de xilosa	+	-	-
ONPG	-	-	+
Indol	+	-	-
Hidrolisis de la urea	-	+	-
Voges Proskauer VP	-	-	+
Utilización de citrato	-	+	-
Triptófano deaminasa TDA	-	-	+
Licuefacción de la gelatina	-	-	+
Inhibición de malonato	-	-	-
Fermentación de inositol	-	-	-
Fermentación de sorbitol	-	-	-
Fermentación de ramnosa	-	-	-
Fermentación de sucrosa	+	-	-
Fermentación de lactosa	-	-	-
Fermentación de arabinosa	-	-	-
Fermentación de adonitol	-	-	-
Fermentación de rafinosa	-	-	-
Fermentación de salicina	-	-	-
Arginina dihidrolasa	-	-	+
Porcentaje de coincidencia de las pruebas	96.2%	97.6%	88.9%
Microorganismo identificado	<i>Pasteurella multocida</i>	<i>Flavobacterium odoratum</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i>

REALIZADO POR: GUAILLA, R. 2015

Tabla 13-3. Distribución porcentual de microorganismos identificados en las aguas termales del balneario Urauco.

Sifio	Código clones	Microorganismos identificados	Porcentaje de microorganismos por sitio	Porcentaje de microorganismo en el balneario Urauco
Manantial	2	<i>Acidovorax delafieldii</i>	14.28%	8.33%
	3	<i>Aeromonas salmonicidas</i> sup. <i>salmonicida</i>	14.28%	8.33%
	4	<i>Pasteurella multocida</i>	14.28%	8.33%
	6	<i>Citrobacter freundii</i>	14.28%	8.33%
	9	<i>Brevundimonas diminuta</i>	14.28%	8.33%
	10	<i>Flavobacterium odoratum</i>	14.28%	8.33%
	26	<i>Vibrio alginolyticus</i>	14.28%	8.33%
Piscina	5	<i>Aeromonas caviae</i>	60%	24.99%
	13	<i>Aeromonas caviae</i>		
	14	<i>Aeromonas caviae</i>		
	7	<i>Budvicia aquatica</i>	20%	8.33%
	12	<i>Bacillus spp.</i>	20%	8.33%

REALIZADO POR: GUAILLA, R. 2015

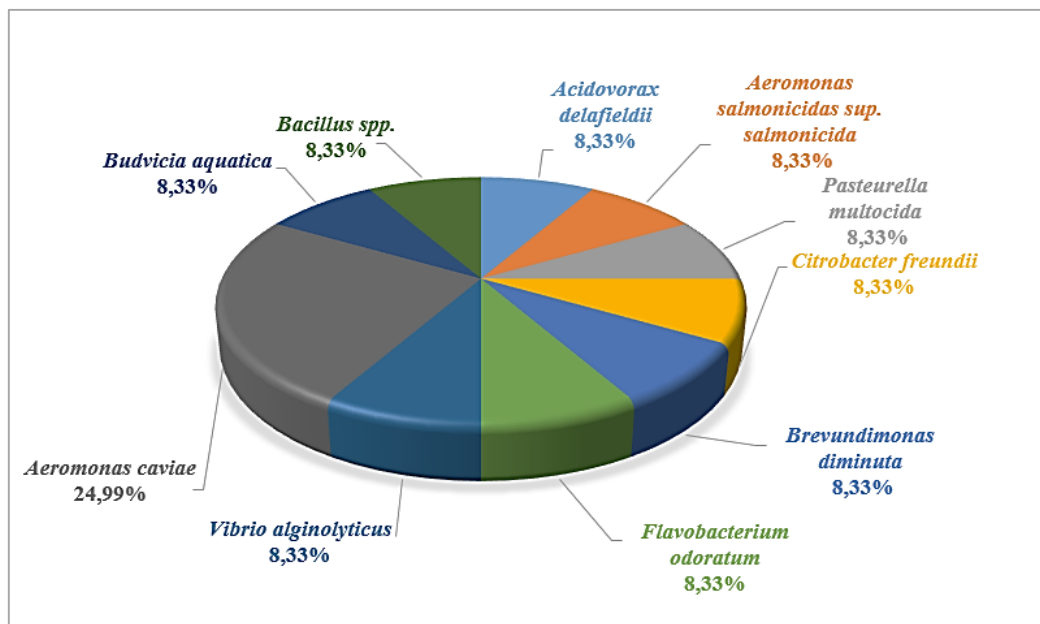


Gráfico 6-3. Porcentaje de microorganismos en el balneario Urauco
REALIZADO POR: GUAILLA R. 2015

Se identificaron un total de doce clones de los cuales siete corresponden al manantial y cinco a la piscina (tabla 13-3 y gráfico 6-3). Al analizar la tabla 13-3 se puede observar que en el manantial se encontraron los géneros *Acidovorax*, *Aeromonas*, *Pasteurella*, *Citrobacter*, *Brevundimonas*, *Flavobacterium* y *Vibrio*, de esta manera cada microorganismo conforma el 14.28% ya que todas pertenecen a diferentes géneros. Por otro lado en la piscina se encontraron los géneros *Aeromonas*, *Budvicia* y *Bacillus*, la mayor población la conforma el género *Aeromonas* con un 60% y las dos bacterias restantes cada una representa el 20% de la diversidad microbiana.

Los resultados obtenidos indican que el manantial es un ambiente con una gran diversidad biológica debido a la variedad de géneros encontrados, en relación a las bacterias de los géneros *Acidovorax*, *Flavobacterium* y *Vibrio*, según Berger, S., en 2015 indica que pueden ser aisladas de diversos ambientes como agua y suelo, en el caso del balneario Urauco el agua del manantial está directamente en contacto con el suelo, lo que explicaría la presencia de estos géneros.

Acidovorax delafieldii anteriormente conocida como *Pseudomonas delafieldii* es una bacteria comúnmente aislada del suelo y en ocasiones del agua, así lo demostraron Guobin, S., et al, en el 2005, asilando esta bacteria a partir de las muestras de aguas residuales del campo petrolífero Shengli de China.

En el caso de *Flavobacterium odoratum*, Bachman, Keith H., et al, en 1996, describieron que es común encontrar esta bacteria en fuentes de agua dulce del medio ambiente, además citan como ejemplo un caso clínico en el cual determinaron que esta bacteria considerada como patógeno oportunista procedía del agua obtenida de un pozo ya que el paciente utilizó ésta agua para beber y bañarse.

La especie *Vibrio alginolyticus* no causa infecciones en el hombre pero si es patógena para animales marinos, varios autores reportan que su origen es el mar, pero al ser reportada en este estudio demuestra la gran versatilidad metabólica de esta bacteria para colonizar otros ambientes.

Las bacterias del género *Vibrio* fueron reportadas por De La Rosa, M., et al, en el 2000, como parte de la flora autóctona de manantiales clorurados sódicos e hipertónicos además en este tipo de aguas también es frecuente encontrar otras bacterias halófilas moderadas como *Halomonas* y *Micrococcus* así como bacterias halotolerantes de los géneros *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, y *Planococcus* que resisten una elevada osmolaridad ya que poseen complejos mecanismos de regulación interna.

La bacteria *Pasteurella multocida*, es descrita como patógeno oportunista para el hombre, forma parte de la flora orofaríngea de ciertos animales, también coloniza el tracto gastrointestinal y respiratorio de una gran variedad de mamíferos y aves, que constituyen su principal reservorio, la colonización por *Pasteurella* está presente en el 66% y 90% de perros y gatos, respectivamente. (CAMPOS, F. 2008).

A diferencia de los demás géneros encontrados en el balneario Urauco *Pasteurella multocida* es una bacteria que hasta ahora no había sido reportada en el agua ni en el suelo, su presencia puede estar relacionada a varios factores como por ejemplo: que un animal haya bebido del manantial o que una persona con una infección en la piel entro en contacto con el agua.

Heym, B., et al, en el 2004 reportaron una infección por *Pasteurella multocida* en un paciente sometido a una artroplastia total de rodilla, esta infección fue debido a que un perro había lamido la herida en el dedo del pie, de la misma rodilla sometida a artroplastia lo que demuestra que esta bacteria está presente en la flora orofaríngea del canino.

Los géneros *Citrobacter*, *Brevundimonas* y *Aeromonas* encontrados en el manantial han sido reportados anteriormente en otros manantiales termales – mineromedicinales, siendo el género *Aeromonas* el que con mayor frecuencia se encontró en el balneario Urauco ya que también fue aislado en la piscina.

En cuanto a *Citrobacter freundii* esta bacteria pertenece al grupo de los coliformes, encontrándose ampliamente distribuida en la naturaleza (suelo, plantas y agua). Mosso, M^a., et al, reportaron este microorganismo en las aguas mineromedicinales de los balneario de Valdelateja en el 2008, al igual que en el balneario de Cervantes en el 2006, indicando que el origen de esta bacteria en aguas subterráneas es generalmente el suelo.

Las bacterias pertenecientes al género *Citrobacter*, especialmente *Citrobacter freundii* son particularmente importantes debido a que se han reportado aislados con capacidad de remover en forma efectiva el cadmio presente en una solución (RODRÍGUEZ, R., et al. 1997). Otra aplicación de esta bacteria fue reportada por Rodríguez, M. J., et al, en 1997, en el tratamiento de aguas residuales con un aislado de *Citrobacter freundii* con actividad tirosinofenolasa, demostrando un alto potencial de descontaminación.

Coscelli, G., en 2015 indica que la bacteria *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* es únicamente patógena para peces, por lo que se trata una especie que se encuentra en ambientes acuáticos. Este género fue reportado por De La Rosa, M^a., et al, en el 2009 en el balneario Alicún

de las Torres; al igual que Mosso, M^a., y De La Rosa, M^a., en el 2011, en el balneario Baños de la Concepción.

La especie *Aeromonas salmonicida* fue aislada en las aguas mineromedicinales de los balnearios de Jaraba por De La Rosa, M^a., et al, en el 2004, específicamente en los manantiales San Luis, Pilas y San José. Esto demuestra la versatilidad metabólica de esta bacteria y la diversidad biológica de las aguas termales del balneario Urauco.

El género *Brevundimonas* fue encontrado en los balnearios de Puente Viesgo por De La Rosa, M^a., et al, en el 2007 y en el balneario de Valdelateja por Mosso, M^a., et al, en el 2008, se trata de un género ampliamente distribuido en la naturaleza, suelo y agua. Mosso, M^a., y De La Rosa, M^a., en el 2011 encontraron la especie *Brevundimonas diminuta* en el balneario Baños de la Concepción, la misma que también fue aislada en el manantial del balneario Urauco.

La mayoría de las especies aisladas en las aguas del manantial concuerdan con los estudios anteriormente mencionados, ya que se trata de un manantial natural que está expuesto al ambiente y el agua tiene contacto con el suelo, factores que son tomados en cuenta por los demás investigadores para el aislamiento de varios microorganismos.

Por otra parte en la Piscina (tabla 13-3), se logró identificar cinco clones que corresponden a tres géneros distintos: *Aeromonas*, *Budvicia* y *Bacillus*, los cuales han sido reportados anteriormente en otros manantiales termales – mineromedicinales. El género *Aeromonas* se aisló en mayor frecuencia y proporción en la piscina y en el balneario Urauco en general.

El género *Aeromonas* ha sido reportado en los manantiales mineromedicinales Alicún de las Torres (DE LA ROSA, M^a., et al. 2009), y Baños de la Concepción (MOSSO, M^a., y DE LA ROSA, M^a. 2011), sin embargo la especie encontrada en la piscina del balneario Urauco corresponde a *Aeromonas caviae*, la misma que según Berger, S., en 2015 indica que ha sido encontrada en agua dulce, aguas residuales y peces.

Budvicia aquatica forma parte de las bacterias autóctonas del agua, ha sido encontrada en diversas regiones del mundo; Mosso M^a., et al, en el 2008, encontraron esta especie en el balneario de Valdelateja, también en nuestro caso esta bacteria forma parte de la microbiota autóctona de la piscina de aguas termales del balneario Urauco.

En cuanto a *Bacillus spp*, estas bacterias provienen del suelo de donde pasan al agua aunque son más comunes en aguas hipertermales también crecen en aguas mesotermas e incluso

hipotermiales, siendo reportadas por Mosso M^a., et al, en el 2008 en el balneario de Valdelateja, también fueron aislados por De La Rosa, M^a., et al, en 2007, en el balneario Puente Viesgo, en nuestro caso esta bacteria se aisló únicamente de la piscina.

Zaragoza, J., en el 2011, describe que algunas bacterias del género *Bacillus spp*, pueden ser productoras de proteasas, otras en cambio pueden ser productoras de amilasas de uso industrial según lo reportado por Rojo, R., et al, en el 2001.

Las bacterias aisladas en la piscina del balneario Urauco concuerdan con los estudios anteriormente mencionados, ya que todos los géneros han sido reportados en otros manantiales termales-mineromedicinales y en el caso de *Budvicia aquatica* es parte de la flora autóctona del agua tomando en cuenta que la muestra se recolectó directamente de la naciente del afluente termal. En cambio las bacterias del manantial del balneario Urauco han sido reportadas no solo en el agua sino también en algunos casos en el suelo y otros hábitats.

3.3 Determinación de la actividad antibacteriana de los clones aislados en el balneario de aguas termales Urauco.

En la tabla 14-3 se observan los resultados obtenidos de la evaluación de la actividad antibacteriana de los doce clones evaluados, *Budvicia aquatica* presentó un halo inhibitorio frente a *Staphylococcus aureus* ATCC25923 y *Flavobacterium odoratum* presento un halo menos pronunciado frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853.

Tabla 14-3. Actividad antibacteriana de los clones aislados del balneario de aguas termales del de Urauco.

Sitio	Bacterias	Halos de clones evaluados (mm)	
		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853
Manantial	<i>Acidovorax delafieldii</i>	-	-
	<i>Aeromonas salmonicidas</i> sup. <i>salmonicida</i>	-	-
	<i>Pasteurella multocida</i>	-	-
	<i>Citrobacter freundii</i>	-	-
	<i>Brevundimonas diminuta</i>	-	-
	<i>Flavobacterium odoratum</i>	-	-
	<i>Vibrio alginolyticus</i>	-	-
Piscina	<i>Aeromonas caviae</i>	-	-
	<i>Budvicia aquatica</i>	9	-
	<i>Bacillus spp.</i>	-	-
	<i>Aeromonas caviae</i>	-	-
	<i>Aeromonas caviae</i>	-	-
- : no presento halo de inhibición			

REALIZADO POR: GUAILLA, R. 2015

La presencia del halo de inhibición producido por *Budvicia aquatica* (tabla 14-3) puede estar relacionada con algún tipo de plásmido adquirido o una sustancia no identificada producida por las bacterias.

En el caso de *Budvicia aquatica* en 1986, Šmarda, J., reportó la producción de bacteriocinas llamadas “aquaticins” producida por distintas cepas de esta bacteria, conjuntamente reportó la producción de “fonticins” a partir de cepas de *Pragia fontium*, al relacionar las dos bacteriocinas estas mostraron actividad antibacteriana hacia ambos géneros.

En este sentido la bacteria *Budvicia aquatica* aislada en las aguas termales del balneario Urauco mostró cierta actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* ATCC25923, aunque no podemos especificar el tipo de sustancia que produce dicha actividad.

Flores, S., en el 2013, reportó que las aguas de los manantiales termales La Mitisús y Santa Apolonia del estado Mérida poseen bacterias que tienen actividades antimicrobianas y antifúngicas, sin embargo ninguno de los géneros encontrados en ese trabajo corresponde a los aislados en las aguas termales del balneario Urauco, pero deja claro que este tipo de aguas poseen bacterias con actividades biológicas.

Mosquera, J., en el 2012, evaluó el efecto antagónico de 17 cepas del género *Pseudomonas*, aisladas de las piscinas termales del balneario “Aguas de Moisés”, municipio Ribero, estado Sucre, Venezuela, todas las cepas de *Pseudomonas* mostraron actividad antagónica contra cepas indicadoras *Escherichia coli* K12 CVCM 178, *Pseudomonas aeruginosa* CVCM 787, *Bacillus subtilis* CVCM 591 y *Staphylococcus aureus* CVCM 636.

Otra investigación que indica la importancia de la actividad antimicrobiana de las bacterias aisladas de ambientes marinos es la realizada por Mancilla, C., en el 2003 aisló *Actinomycetes* a partir de muestras de agua y sedimentos marinos, reportando que el 68,9 % de los *Actinomycetes* presentaron actividad antimicrobiana dirigida principalmente contra la levadura *C. albicans*.

Los ambientes acuáticos en general poseen gran cantidad de bacterias con propiedades antimicrobianas frente a distintos tipos de bacterias indicadoras algunas patógenas para el hombre, así lo demostraron los autores de los trabajos anteriormente mencionados, de esta manera como se encontraron en el balneario de aguas termales Urauco dos bacterias que podrían tener un efecto inhibitorio frente a bacterias indicadoras, es necesario un análisis más exhaustivo para aislar otros géneros que tengan funciones antimicrobianas y/o antifúngicas.

3.4 Perfil de susceptibilidad de los clones aislados del balneario de aguas termales Urauco frente a diversos antibióticos.

En la tabla 15-3, se pueden observar que los once clones de bacilos Gram negativos son sensibles a tres antibióticos (Ceftriaxona, Gentamicina y Trimetropim/sulfametoxazol), en el caso de Imipenem se aplicó a ocho clones siendo todos sensibles, por otra parte cinco clones presentaron resistencia a tres antibióticos (Amoxicilina, Amoxicilina/ácido clavulánico y Cefalotina), un clon presentó resistencia a dos antibióticos (Ampicilina y Cefalotina), cuatro clones presentaron resistencia a un antibiótico (Ampicilina) y un clon fue sensible a todos los antibióticos utilizados.

Tabla 15-3. Susceptibilidad a diversos antibióticos de las bacterias Gram negativas aisladas en las aguas termales del balneario Urauco

Sitio	Micoorganismos	Antibióticos						
		Ampicilina	Amoxicilina/ ácido clavulánico	Cefalotina	Ceftriaxona	Gentamicina	Trimetoprima/ sulfametoxazol	Imipenem
Manantial	<i>Acidovorax delafieldii</i>	R	S	S	S	S	S	Nd
	<i>Aeromonas salmonicidas</i> subsp. <i>salmonicida</i>	R	R	R	S	S	S	S
	<i>Pasteurella multocida</i>	R	R	R	S	S	S	Nd
	<i>Citrobacter freundii</i>	R	R	R	S	S	S	S
	<i>Brevundimonas diminuta</i>	R	S	S	S	S	S	S
	<i>Flavobacterium odoratum</i>	S	S	S	S	S	S	Nd
	<i>Vibrio alginolyticus</i>	R	S	S	S	S	S	S
Piscina	<i>Aeromonas caviae</i>	R	R	R	S	S	S	S
	<i>Budvicia aquatica</i>	S	S	R	S	S	S	S
	<i>Aeromonas caviae</i>	R	S	R	S	S	S	S
	<i>Aeromonas caviae</i>	R	R	R	S	S	S	S

R: resistente
S: sensible
Nd: no determinado

REALIZADO POR: GUAILLA, R. 2015

Las bacterias analizadas presentaron un mayor porcentaje de resistencia frente a Ampicilina (81.8%), mientras que para Cefalotina y Amoxicilina/ácido clavulánico la resistencia fue menor (63.6% y 45.5% respectivamente). También se encontró que el 100% de las bacterias analizadas

fueron sensibles a Gentamicina, Imipenem, Trimetropim/sulfametoxazol y Ceftriaxona, según se detalla en la tabla 16.3 y gráfico 7-3.

Tabla 16-3. Porcentaje de susceptibilidad y resistencia de bacterias Gram negativas frente a diversos antibióticos

Agente antimicrobiano	Contenido del disco	N°	Bacterias Sensibles		Bacterias resistentes	
			n°	%	n°	%
Ampicilina (AM)	10mcg	11	2	18.2	9	81.8
Amoxicilina/ácido clavulánico (AMC)	20/10mcg	11	6	54.5	5	45.5
Cefalotina (KF)	30mcg	11	4	36.4	7	63.6
Ceftriaxona (CRO)	30mcg	11	11	100	0	0
Gentamicina (CN)	10mcg	11	11	100	0	0
Imipenem (IPM)	10mcg	8	8	100	0	0
Trimetoprim/sulfametoxazol (STX)	1.25/23.75 mcg	11	11	100	0	0

REALIZADO POR: GUAILLA, R. 2015

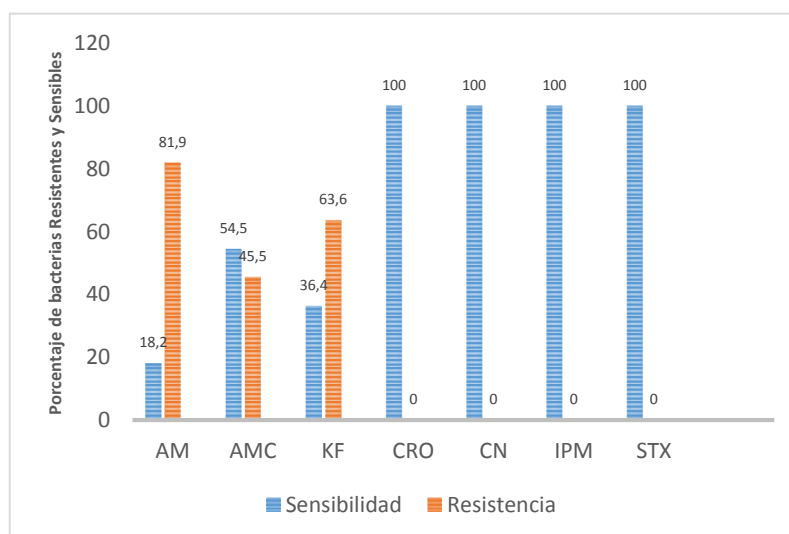


Gráfico 7-3. Porcentaje de susceptibilidad y resistencia de bacterias Gram negativas frente a distintos antibióticos

REALIZADO POR: GUAILLA, R. 2015

Con respecto al bacilo Gram positivo, que pertenece al género *Bacillus*, este presentó resistencia a tres antibióticos (Ampicilina, Penicilina y Oxacilina) y fue sensible a cuatro antibióticos (Amoxicilina/ácido clavulánico, Imipenem, Eritromicina y Ciprofloxacina), según se detalla en la tabla 17-3.

Tabla 17-3. Susceptibilidad a diversos antibióticos del género *Bacillus* (Gram positivo) aislado en la piscina del balneario de Urauco

Sitio	Microorganismo	Antibióticos						
		Ampicilina	Amoxicilina/ ácido clavulánico	Imipenem	Eritromicina	Ciprofloxacina	Penicilina	Oxacilina
Piscina	<i>Bacillus spp.</i>	R	S	S	S	S	R	R
R: resistente S: sensible								

REALIZADO POR: GUAILLA, R. 2015

La resistencia a determinados antibióticos pudo estar relacionada con la presencia de las bacterias aloctonas, por ejemplo las que provienen de los bañistas, estos microorganismos alóctonos pueden poseer ciertos genes de resistencia los mismos que serían transmitidos mediante plásmidos, transpones o integrones a las bacterias propias del agua.

Al contrastar con otros trabajos donde se asilaron bacterias de aguas termales y minerales, que no precisamente corresponde a los mismos géneros encontrados en la presente investigación, podemos comprobar que existen tanto resistencia como susceptibilidad a ciertos antibióticos que también se usaron en este trabajo.

Flores, S., en el 2013, en un estudio sobre las aguas de los manantiales termales la Mitisús y Santa Apolonia del estado de Mérida encontró que todas las cepas son resistentes a amoxicilina/ácido clavulánico, siendo también todas sensibles a gentamicina. En relación a estos antibióticos estos resultados son similares a los que se obtuvieron al evaluar las cepas aisladas en el presente estudio.

Messi, P., et al en el 2005, reportan el aislamiento de bacterias resistentes a antibióticos a partir de aguas minerales, en donde más del 80% de las cepas aisladas presentan resistencia a uno o más antibióticos; en relación a la Ampicilina el 55% de las cepas aisladas poseen resistencia a este antibiótico, y en el caso de las bacterias Gram negativas del balneario Urauco estas tiene un 81.8% de resistencia a este mismo antibiótico.

Valencia P., en el 2009, estudió la transferencia horizontal de genes de resistencia a antibióticos provenientes de bacterias ambientales hacia *E. coli* k12, encontró diez aislados bacterianos capaces de transferir sus genes de resistencia a antibióticos mediante conjugación, siendo las resistencias a ampicilina, tetraciclina, cloranfenicol y trimetoprim sulfametoxazol las más difundidas, las bacterias identificadas correspondieron a los géneros *Serratia*, *Pseudomona*, *Listonella*, y *Aeromonas*.

En el mismo contexto, en el balneario Urauco también se encontró el género *Aeromonas*, presentando similitud con el estudio anteriormente mencionado con respecto a la resistencia frente a ampicilina independientemente de cual sea la causa de la resistencia, pero difiere en frente a Trimetoprim sulfametoxazol ya que fue sensible a ese antibiótico.

En el caso del género *Aeromonas*, provenientes del agua de consumo, estas tienen resistencia a la ampicilina además estudios *in vitro* indican una resistencia a la Cefalotina, son sensibles a gentamicina e imipenem (JUNCO, R., et al. 2006)., se hace énfasis a estos antibióticos ya que son los que se utilizaron en esta investigación, siendo los resultados similares a los obtenidos al evaluar la resistencia y susceptibilidad de las *Aeromonas* aisladas en el balneario Urauco frente a los antibióticos mencionados anteriormente.

Bachman, Keith H., et al, en 1996, describieron que *Flavobacterium odoratum* fue aislada del hemocultivo de un paciente hospitalizado, este microorganismos presentó resistencia a vancomicina, gentamicina, amikacina, cefazolina, ceftazidima, además presento sensibilidad intermedia a ceftriaxona y fue susceptible a trimetoprim-sulfametoxazol, piperacilina e imipenem. Estos resultados difieren de los obtenidos en la presente investigación ya que se trata de una bacteria aislada directamente del agua, la misma que resulto ser sensible a gentamicina, pero en el caso de trimetoprim-sulfametoxazol y ceftriaxona los resultados son los mismos.

Restrepo, M., et al, en el 2010, reportaron un caso clínico en el que se aisló la bacteria *Brevundimonas diminuta*, el Centro para Control de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC) y otros estudios mostraron que las especies de *Brevundimonas* presentaron susceptibilidad a los

aminoglucósidos, susceptibilidad variable a penicilinas antipseudomonas y cefalosporinas de tercera generación, y una resistencia importante a ampicilina.

Al comparar la especie de *Brevundimonas diminuta* aislada en el balneario Urauco con la descrita en el estudio anterior, también presentó resistencia a ampicilina y resultó ser sensible a Ceftriaxona, gentamicina por lo que los resultados con respecto a estos antibióticos son similares a los reportados anteriormente.

En el 2006, Olea, T., et al, describieron un caso de peritonitis por *Pasteurella multocida* y *Candida albicans*, en el cual se indica que el tratamiento para este microorganismo se basa en penicilina, ampicilina, cefalosporinas de segunda y tercera generación, tetraciclinas y cloranfenicol, la sensibilidad a los aminoglucósidos es variable y la resistencia a vancomicina como a clindamicina es habitual.

En el caso de la bacteria *Pasteurella multocida* que fue aislada en el presente estudio, esta presentó susceptibilidad a Ceftriaxona (cefalosporina de tercera generación), lo que concuerda con el tratamiento descrito en el caso reportado por Olea, T., et al en el 2006, en relación a Gentamicina (aminoglucósido) *Pasteurella multocida* también fue sensible, pero en el caso de ampicilina los resultados difieren por completo ya que la bacteria aislada en el balneario Urauco fue resistente a dicho antibiótico.

En el 2006, Lösch, Liliana S., et al estudiaron el perfil de sensibilidad antibiótica en especies de la Familia Enterobacteriaceae aisladas de fuentes de agua de la provincia del Chaco en donde encontraron 5 cepas de *Citrobacter freundii*, dos cepas de origen subterráneo resultaron ser resistentes al ácido nalidíxico y sensibles a cloranfenicol, gentamicina, trimetoprim/sulfametoxazol, cefotaxima y ceftazidima.

En nuestro caso los resultados obtenidos con el clon de *Citrobacter freundii* aislado del balneario Urauco, en cuanto a la sensibilidad a los antibióticos gentamicina y trimetoprim/sulfametoxazol coinciden a lo reportado por Lösch, Liliana S., et al en el 2006.

Faría, J. F., et al, en el 2005, identificaron seis especies del género *Bacillus* aislados de leche de bovinos, el 90% de las cepas presentaron resistencia múltiple frente a penicilina, oxacilina, clindamicina, ampicilina, trimetoprim/sulfametoxazol y ocasionalmente a otros fármacos como rifampicina, vancomicina y eritromicina, estas bacterias resultaron ser sensibles a tetraciclina, cloranfenicol, gentamicina y ciprofloxacina.

El clon del género *Bacillus* aislado en el balneario Urauco al igual que los aislados en el estudio anterior presentó resistencia múltiple frente a penicilina, oxacilina y ampicilina, esta resistencia puede ser causada por modificación enzimática del agente antimicrobiano debido a la producción de β -lactamasa. Mientras que la susceptibilidad fue reportada frente a amoxicilina/ácido clavulánico, imipenem, eritromicina y ciprofloxacina.

En 2007 Corbin, A., et al, reportaron un caso de sepsis en un paciente inmunodeprimido en el cual se aisló *Budvicia aquatica*, encontrándose que la bacteria era sensible a amikacina, ampicilina, ceftazolin, ceftoxin, ceftriaxona, cefuroxima, ciprofloxacina, gentamicina, imipenem, piperacilina, ticarcilina/ácido clavulánico y trimetoprim/sulfametoxazol.

Los resultados obtenidos en el antibiograma realizado al clon de *Budvicia aquatica* aislado en el balneario Urauco concuerdan con lo descrito anteriormente para los antibióticos ampicilina, ceftriaxona, gentamicina y trimetoprim/sulfametoxazol.

Rivera, O., en 2010 describió el caso de un paciente inmunodeprimido que presentó una bacteriemia, el microorganismo aislado fue *Vibrio alginolyticus* el mismo que fue sensible a carbapenems, cefalosporinas de tercera y cuarta generación, los aminoglucósidos, quinolonas y tetraciclinas podrían considerarse tratamiento de elección junto con las cefalosporinas mencionadas recientemente, el patrón de resistencia más frecuente se registró para ampicilina, cefazolina, cloranfenicol, estreptomina, sulfonamidas y el trimetoprim.

Los resultados obtenidos en el caso descrito anteriormente, son similares a los encontrados en el balneario Urauco donde la especie *Vibrio alginolyticus* aislada en estas aguas fue resistente a ampicilina, y fue sensible a ceftriaxona (cefalosporina de tercera generación), gentamicina (aminoglucósido) e imipenem (carbapenems).

3.4.1 Detección de metalo β -lactamasas (grupo B)

En la tabla 18-3 se puede observar que en los siete clones evaluados no se detectó la presencia de las enzimas metalo β -lactamasas clase B.

Tabla 18-3. Evaluación fenotípica de la producción de metalo β -lactamasas en las bacterias aisladas en el balneario de aguas termales Urauco

Sitio	Microorganismos	Métalo β -lactamasas (EDTA)	
Manantial	2	<i>Acidovorax delafieldii</i>	Negativo
	3	<i>Aeromonas salmonicidas</i> sup. <i>salmonicida</i>	Negativo
	4	<i>Pasteurella multocida</i>	Negativo
	10	<i>Flavobacterium odoratum</i>	Negativo
Piscina	5	<i>Aeromonas caviae</i>	Negativo
	7	<i>Budvicia aquatica</i>	Negativo
	14	<i>Aeromonas caviae</i>	Negativo

REALIZADO POR: GUAILLA, R. 2015

Cuando las bacterias son productoras de enzimas metalo β -lactamasas se observan halos muy pequeños o ausencia de los mismo alrededor de los discos de imipenem, meropenem y EDTA, en los clones analizados se presentaron halos muy pronunciados por lo que no se observó un efecto sinérgico entre los carbapenemos (imipenem, meropenem) y el EDTA, de esta manera comprobamos la ausencia de este tipo de enzimas.

Como se mencionó anteriormente el hábitat de las aguas termales no permite un ambiente adecuado para el desarrollo de ciertos mecanismos de resistencia, sin embargo son pocos los estudios realizados en este tipo de aguas, por lo que este estudio da una iniciativa de manera general acerca de la presencia de algún tipo de metalo β -lactamasas.

En un estudio realizado por Navajas, E, en el 2014, se analizaron las Enterobacterias obtenidas de muestras de aire del entorno de una granja bovina, encontrándose que todas las pruebas realizadas para la identificación fenotípica de metalo β -lactamasas fueron negativas; las bacterias aisladas en las aguas termales del balneario Urauco tienen similares resultados.

CONCLUSIONES

Con respecto al recuento de los microorganismos indicadores de calidad sanitaria en el balneario Urauco se encontró 5.3×10^2 UFC/mL de aerobios mesófilos, 57 UFC/mL de coliformes totales, 2 UFC/mL *E. coli*, 1 UFC/mL de mohos y 35 UFC/mL levaduras.

En el presente estudio se reportaron 14 aislados bacterianos considerados como puros de los cuales se identificaron 12, demostrando que las aguas termales del balneario Urauco están formadas principalmente por bacilos: 92.9% bacilos Gram negativos y 7.1% de bacilos Gram positivos.

En el balneario de aguas termales Urauco se identificaron 8 géneros de bacilos Gram negativos los mismos que corresponde a *Acidovorax*, *Pasteurella*, *Citrobacter*, *Brevundimonas*, *Flavobacterium*, *Vibrio*, *Aeromonas*, *Budvicia* y 1 género de bacilo Gram positivo identificado como *Bacillus*.

El género *Aeromonas* fue encontrado con mayor frecuencia en las aguas termales del balneario Urauco, el mismo que fue identificado en cuatro aislados bacterianos y la especie encontrada en mayor proporción fue *Aeromonas caviae*.

El 100% de las bacterias Gram negativas presentaron sensibilidad frente a ceftriaxona, gentamicina, imipenem y trimetoprim/sulfametoxazol, la resistencia antimicrobiana se presentó principalmente a la ampicilina 81.8%; cefalotina 63.6%; amoxicilina/ácido clavulánico 45.5%; además ninguna bacteria es productora de enzimas metalo β -lactamasas del grupo B.

Las bacterias Gram negativas que presentaron resistencia múltiple frente a ampicilina, amoxicilina/ácido clavulánico y cefalotina fueron: *Aeromonas salmonicidas subsp. salmonicida*, *Pasteurella multocida*, *Citrobacter freundii*, *Aeromonas caviae*, al igual que el bacilo Gram positivo *Bacillus spp*, que fue multirresistente a ampicilina, penicilina y oxacilina.

Se asiló un clon de *Budvicia aquatica* capaz de inhibir el crecimiento de *S. aureus* ATCC25923.

RECOMENDACIONES

Se recomienda continuar con la identificación bacteriana utilizando métodos moleculares y proteómicos para confirmar la identidad de las cepas bacterianas.

Comprobar si los géneros bacterianos aislados en las aguas termales del balneario Urauco pueden ser patógenos o pueden tener uso industrial especialmente *Budvicia aquatica*, ya que en otros trabajos realizados anteriormente se reporta que los microorganismos aislados de los medios acuáticos son productores de sustancia bioactivas.

Realizar otros estudios microbiológicos en diferentes épocas del año para determinar si la microbiota de las aguas termales del balneario Urauco puede variar con el cambio estacional.

Impulsar la creación de una normativa que permita regular la calidad microbiológica de las aguas utilizadas como medicinales y de recreación.

BIBLIOGRAFÍA

1. **ABORDO.** *Ciudades termales del Ecuador.* Quito-Ecuador. 2013, pp. 52-62. Disponible en: <http://www.abordo.com.ec/abordo/pdf/106.pdf>
2015/04/01.
2. **ADAM, W & BAUDER, J.** *Alcalinidad, pH, y Sólidos Disueltos Totales.* Montana-Estados Unidos de América. 2012, p. 1. Disponible en:
http://region8water.colostate.edu/PDFs/we_espanol/Alkalinity_pH_TDS%202012-11-15-SP.pdf
2015/05/30
3. **ALVAREZ, María; & BOQUET, Ernesto.** *Manual de Técnicas en Microbiología Clínica.* 2ª ed. Madrid-España. Graficart. 1995. p. 24.
4. **AQUIAHUATL, María, PÉREZ, María.** *Manual de prácticas de laboratorio de microbiología general.* México DF-México. Universidad Autónoma Metropolitana. 2004. p. 41.
5. **ARCOS, Mireya del Pilar et al.** “Indicadores microbiológicos de contaminación de las fuentes de agua”. *Nova*, vol. 3, N° 4, 2005. Cundinamarca-Colombia. pp. 69-79. Disponible en:
<http://www.unicolmayor.edu.co/publicaciones/index.php/nova/article/view/47/92>
2015/06/30
6. **AZNAR, Antonio.** “Determinación de los parámetros fisico-químicos de la calidad de las agua”. *Gestión ambiental*, vol. 2, N° 23, 2000. Madrid-España. pp. 3-8.
7. **BACHMAN, Keith H., et al.** “Recurrent cellulitis and bacteremia caused by *Flavobacterium odoratum*”. *Clinical infectious diseases*, vol. 22, N° 6, 1996. Portland-United State of America. pp. 1112-1113.
8. **BARROW, G; & FELTHAM, R.** *Cowan and Steel's Manual for Identification of Medical Bacteria.* 3ª ed. Cambridge-Inglaterra. Cambridge University Press. 1993. p. 203.

9. **BERGER, Stephen.** Gideon guide to medically important bacteria. Los Ángeles- United State of America. E-book series. 2015. pp. 126; 348.
10. **BORJA, Jackelyn et al.** “Bacterias halotolerantes productoras de hidrolasas aisladas de aguas termales de Tarapoto”. *Ciencia e Investigación*, vol. 15, N° 2, 2013. Tarapoto-Perú. pp. 66-70. Disponible en:
<http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/farma/article/view/2659/2326>
2015/04/06
11. **BOU, Germán et al.** “Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología”. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, vol. 29, N° 8, 2011. España. pp. 601-608.
12. **BURBANO, N et al.** *Aguas termominerales del Ecuador: INAMHI*. Quito-Ecuador. 2013. pp. 79; 82. Disponible en: <http://issuu.com/inamhi/docs/termalismo>
2015/04/06
13. **CAMPOS, J et al.** “Bacteriemias primarias por *Pasteurella multocida*”. *An. Med. Interna*, vol. 25, N° 7, 2008. Madrid-España. pp. 374-374. Disponible en:
http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S0212-71992008000700016&script=sci_arttext
2015/05/28
14. **CANARIAS. BOLETÍN OFICIAL N° 38. ORDEN DE 2 DE MARZO DE 1989.** *Regulación del régimen técnico-sanitario de piscinas*. 1989. p. 535. Disponible en:
<http://www.gobiernodecanarias.org/boc/1989/038/boc-1989-038-002.pdf>
2015/06/25
15. **CORBIN, Angela et al.** “*Budvicia aquatica* sepsis in an immunocompromised patient following exposure to the aftermath of Hurricane Katrina”. *Journal of medical microbiology*, vol. 56, N° 8, 2007. New Orleans-United State of America. pp. 1124-1125.

16. **COSCELLI B, Germán A.** Estudio de la patogenia y de los mecanismos inmunológicos en la infección por *Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida* en rodaballos (*Scophthalmus maximus*). (TESIS DOCTORAL). Universidad de Santiago de Compostela, Facultad de Veterinaria, Departamento de Ciencias Clínicas Veterinarias, Lugo-España. 2014, p. 16. Disponible en:
file:///C:/Users/Usuario/Downloads/rep_806.pdf
2015/05/09

17. **COURVALIN, P.** “Predictable and unpredictable evolution of antibiotic resistance”. *Journal of internal medicine*, vol. 264, N° 1, 2008. París-Francia. pp. 4-16. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2796.2008.01940.x/epdf>
2015/05/30

18. **DE LA ROSA, M. C et al.** “Microbiología de las aguas mineromedicinales de los Balnearios de Jaraba”. *Anales Real Academia Nacional de farmacia*, vol. 70. 2004. Madrid-España. pp. 521-542.

19. **DE LA ROSA, M^a del Carmen & MOSSO, M^a Ángeles.** Panorama actual de las Aguas Minerales y Minero-medicinales en España: Diversidad microbiana de las aguas minerales termales. Madrid-España. Instituto Tecnológico Geominero de España. 2000. pp. 153-159.

20. **DE LA ROSA, M^a et al.** “Microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario de Alicún de las Torres”. *Anales Real Academia Nacional de farmacia*, vol. 75. 2009. Madrid -España. pp. 763-780.

21. **DE LA ROSA, M^a et al.** “Microbiología del manantial mineromedicinal del Balneario Puente Viesgo”. *Anales Real Academia Nacional de farmacia*, vol. 73. 2007. Madrid-España. pp. 251-265.

22. **ECUADOR. INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN (INEN).** Control microbiológico de los alimentos. Mohos y levaduras viables. Recuento en placa siembra por profundidad. NTE INEN 1529-10:2013. Quito-Ecuador. 2013. p. 1

23. **ECUADOR. INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN (INEN).** Control microbiológico de los alimentos. *Staphylococcus aureus*. Recuento en placa siembra por extensión en superficie. NTE INEN 1529-14:2013. Quito. 2013. p. 1
24. **FAGUNDO, J.** Química del agua Kárstica: Hidroquímica del Karst. Granada-Osuna-España. Universidad de Granada. 1996. p. 20.
25. **FARÍA, José et al.** “Sensibilidad a los agentes antimicrobianos de algunos patógenos mastitogénicos aislados de leche de cuartos de bovinos mestizos doble propósito”. *Revista Científica, FCV-LUZ*, vol. 15, N° 3, 2005. Maracaibo-Venezuela. pp. 227-234.
26. **FERNÁNDEZ, M at al.** “Transmisión fecohídrica y virus de la hepatitis A”. *Higiene y sanidad ambiental*”, vol. 1. 2001. Granada-España. pp. 8-18.
27. **FERNÁNDEZ, Rafael.; SMITS, Gunta.** “Hifomicetos acuáticos de la cabecera del río Guárico, estado Carabobo, Venezuela”. *Interciencia*, vol. 36, N° 11, 2011. Caracas-Venezuela. pp. 831-834.
28. **FLORES, Mónica et al.** “Bacterias halotolerantes con actividad lipolítica aisladas de las Salinas de Pilluana-San Martín”. *Ciencia e Investigación*, vol. 13, N° 2, 2010. Lima - Perú. pp. 88-92. Disponible en: http://revistas.concytec.gob.pe/scielo.php?pid=S1609-90442010000200007&script=sci_arttext
2015/05/02
29. **FLORES, Sandra.** Aislamiento, identificación y detección de microorganismos, con actividades biológicas, procedentes de las aguas de los manantiales termales LA MITISÚS y SANTA APOLONIA del estado Mérida. (TESIS DE MAESTRÍA). Universidad de los Andes, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Mérida-Venezuela. 2013, pp. 5; 39; 161.
30. **GARAY-TINOCO, J., et al.** *Manual de técnicas analíticas para la determinación de parámetros fisicoquímicos y contaminantes marinos: aguas, sedimentos y organismos.* Santa Martha-Colombia. 2003. pp. 21; 30 Disponible en:
<http://www.invemar.org.co/redcostera1/invemar/docs/7010manualTecnicasanaliticas..pdf>
2014/10/17

31. **GARCÍA, Vera.** Introducción a la Microbiología. 2ª ed. Costa Rica. EUNED. 2004. p.85.
32. **GEOSALUD.** *Las aguas termales y sus propiedades curativas.* San José-Costa Rica. 2014. Disponible en: http://www.geosalud.com/aguas_termales/aguas_termales.htm
2015/03/29
33. **GONZALES, Edgar.** “Métalo-β-lactamasas: ¿el fin de los β-lactámicos?”. *Revista peruana de epidemiología*, vol. 16, N° 3, 2012. Lima-Perú. pp. 1-8. Disponible en: http://sisbib.unmsm.edu.pe/Bvrevistas/epidemiologia/v16_n3/pdf/a02v16n3.pdf
2015/04/03
34. **GUEVARA, Antonio.** *Control de calidad del agua. Métodos de análisis para la evaluación de la calidad del agua.* Lima-Peru. 1996. pp. 10-11. Disponible en: <http://www.bvsde.ops-oms.org/bvsacd/scan2/031279/031279.pdf>
2015/04/12
35. **GUOBIN, S et al.** “Biodesulfurization using *Pseudomonas delafieldii* in magnetic polyvinyl alcohol beads”. *Letters in applied microbiology*, vol. 40, N° 1, 2005. Beijing-China. pp. 30-36. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1472-765X.2004.01617.x/epdf>
2015/06/03
36. **GUZMAN, Esteban.** Aislamiento y caracterización de bacterias solubilizadoras de fósforo a partir de cuatro suelos de la provincia de Chimborazo. (TESIS). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Recursos Naturales, Escuela de Ingeniería Agronómica, Riobamba-Ecuador. 2011, p. 23
37. **HEYM, Beate et al.** “*Pasteurella multocida* infection of a total knee arthroplasty after a “dog lick””. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, vol. 14, N° 10, 2006. Alemania. pp. 993-997. Disponible en: <http://rd.springer.com/article/10.1007/s00167-005-0022-5>
2015/05/03

38. **JIMÉNEZ, R.** *Indicaciones y técnicas crenoterápicas de las aguas minero-medicinales.* Madrid-España. 2002. pp. 247-252. Disponible en: http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/rehabilitacion-bal/in_n10c.pdf
2015/04/01
39. **JUNCO, R. et al.** “Sensibilidad antimicrobiana en bacterias de origen ambiental”. *Hig Sanid Ambient*, vol. 6. 2006. La Habana-Cuba. pp. 150-159.
40. **LABORATORIOS BRITANIA.** *Kligler hierro agar.* Buenos Aires-Argentina. 2010. Disponible en: http://www.britanialab.com/productos/565_hoja_tecnica_es.pdf
2015/04/06
41. **LAGARTO, Alicia,; BERNAL, Ingrid.** “Utilización terapéutica de las aguas y fangos mineromedicinales”. *Rev. Cubana Farm*, vol. 36, N° 1, 2002. La Habana-Cuba. pp. 62-68. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152002000100009
2015/04/07
42. **LARREA, J et al.** “Evaluación de la calidad microbiológica de las aguas del complejo turístico “Las Terrazas”, Pinar del Río (Cuba)”. *Hig San Ambient*, vol. 9. 2009. La Habana-Cuba. pp. 492-504. Disponible en: [http://saludpublica.es/secciones/revista/revistaspdf/bc5101912f2019d_Hig.Sanid.Ambient.9.492-504\(2009\).pdf](http://saludpublica.es/secciones/revista/revistaspdf/bc5101912f2019d_Hig.Sanid.Ambient.9.492-504(2009).pdf)
2015/04/07
43. **LECHEVALLIER, Mark et al.** “Examination and characterization of distribution system biofilms”. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 53, N° 12, 1987. United State of America. pp. 2714-2724.
44. **LECLERC, H; & MOSSEL, D.** *Microbiologie: le tube digestif, l'eau et les aliments.* Paris-Francia. Doin. 1989. p. 592.
45. **LEÓN, Jorge et al.** “Bacterias marinas productoras de compuestos antibacterianos aisladas a partir de invertebrados intermareales”. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, vol. 27, N° 2, 2010. Lima-Perú. pp. 215-221.

46. **LIMA-BITTENCOURT, C. I et al.** “Multiple antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae isolates from pristine freshwater”. *Genet Mol Res*, vol. 6, N° 3, 2007. Belo Horizonte-Brasil. pp. 510-521.
47. **LLOPIS, María del Mar.** Bajo la mirada de Heracles: El agua se torna fuente de salud y placer. Barcelona-España. Erasmus. 2013. p. 161.
48. **LÖSCH, Liliana et al.** “Estudio del perfil de sensibilidad antibiótica en especies de la Familia Enterobacteriaceae aisladas de fuentes de agua de la provincia del Chaco”. *Red*, vol. 2, N° 2, 2006. Argentina. p. 9.
49. **MacFADDIN, Jean.** Pruebas bioquímicas para la identificación de Bacterias de importancia clínica. 3ª ed. Buenos Aires-Argentina. Editorial médica panamericana. 2003. pp. 73; 92; 353; 397.
50. **MADIGAN, M; MARTINKO, J; & PARKER, J.** Biología de los microorganismos. 10ª ed. Madrid-España. Pearson-Prentice Hall. 2004. p. 56.
51. **MANCILLA, Carolina.** Aislamiento, caracterización y actividad antimicrobiana de la Microbiota Bacteriana de agua y sedimentos marinos de la costa de Valdivia. (TESIS). Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias, Valdivia-Chile. 2003. p. 6. Disponible en: <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2003/fcm269a/doc/fcm269a.pdf>
2015/05/01
52. **MARÍN, R.** Físicoquímica y microbiología de los medios acuáticos: Tratamiento y control de calidad de aguas. Madrid-España. Díaz de Santos, S.A. 2003. pp. 75-76; 122.
53. **MEDIOS DE DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO (MDM).** *Series De Identificación Bioquímica UREA-CITRATO-LISINA-SIM-TSI.* 2013. Antioquia-Colombia. pp. 1-3. Disponible en: <file:///C:/Users/Usuario/Downloads/O-P.PD-20-INSERTO-Series-de-Identificacion-Bioquimica.pdf>
2015/05/04
54. **MESSI, Patrizia et al.** “Antibiotic resistance and antibacterial activity in heterotrophic bacteria of mineral water origin”. *Science of the total environment*, vol. 346, N° 1, 2005. España. pp. 213-219.

55. **MICROGEN BIOPRODUCTS.** *MicrogenTM GN-ID Identificación.* Camberley-Inglaterra. 2004. pp. 1-21. Disponible en: <http://www.mediatec.com/chi/files/MICROGEN-GN-ID-MID64-641-65..pdf>
2015/04/30
56. **MONTAÑO, N., et al.** *Los microorganismos: pequeños gigantes.* México DF-México. 2010. pp. 15-30. Disponible en: <http://www.elementos.buap.mx/num77/pdf/15.pdf>
2015/05/30
57. **MOORE, J et al.** “Incidence of *Pseudomonas aeruginosa* in recreational and hydrotherapy pools”. *Communicable disease and public health/PHLS*, vol. 5, N° 1, 2002. Manchester-Inglaterra. pp. 23-26.
58. **MORA, Darner.** “Criterios Microbiológicos para Evaluar la Calidad del Agua en sus Diferentes Usos”. *Rev. Costarricense salud pública*, vol. 5, N° 9, 1996. San José-Costa Rica. pp. 23-33.
59. **MOSQUERA, Johana.** Efecto Antagónico de *Pseudomonas Spp.* Aisladas de las Pozas Termales “Aguas de Moisés”, Cariaco, Municipio Riber Estado Sucre. (TESIS). Universidad De Oriente Núcleo De Sucre, Escuela De Ciencias, Departamento De Bioanálisis, Cumaná-Venezuela, 2012. pp. 11; 18. Disponible en: http://ri.biblioteca.udo.edu.ve/bitstream/123456789/3904/1/TESIS_JM.pdf
2015/06/01
60. **MOSSO, M^a et al.** “Heterotrophic bacterial populations in the mineral waters of thermal springs in Spain”. *Journal of applied bacteriology*, vol. 77, N° 4. 1994. Madrid-España. pp. 370-381.
61. **MOSSO, M^a et al.** “Microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario de Valdelateja”. *Anales Real Academia Nacional de Farmacia*, vol. 74. 2008. Madrid-España. pp. 505-521.
62. **MOSSO, M^a et al.** “Microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario Cervantes”. *Anales Real Academia Nacional de Farmacia*, vol. 72. 2006. Madrid-España. pp. 285-304.

63. **MOSSO, M^a;** **De La ROSA, M^a.** “Microbiología de los manantiales mineromedicinales del balneario de baños de la Concepción”. *Anales Real Academia Nacional de Farmacia*, vol. 77. 2011. Madrid-España. pp. 57-73.
64. **MURRAY, Patrick;** **ROSENTHAL, Ken;** **& PFALLER, Michael.** Microbiología médica. 6^a ed. Barcelona-España. Elsevier. 2009. p. 13.
65. **NAVAJAS, Enrique.** Diseminación aérea de Enterobacterias en el entorno de una granja bovina y estudio de los fenotipos y genotipos de resistencia a antibióticos. (TESIS). Universidad de la Rioja, Facultad de Ciencias, Estudios Agroalimentarios e Informática. España. 2014, pp. 8; 27; 42. Disponible en: http://biblioteca.unirioja.es/tfe_e/TFE000669.pdf
2015/06/01
66. **NAVARRO, Ferran et al.** “Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos gramnegativos”. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, vol. 29, N° 7, 2011. Ámsterdam-Holanda. pp. 524-534.
67. **OLEA, T et al.** “Peritonitis por *Pasteurella multocida* y *Candida albicans*”. *Nefrología*, vol. 26, N° 1, 2006. Madrid-España. pp. 136-138.
68. **PASCUAL, María;** **& CALDERÓN, Vicente.** Microbiología alimentaria: metodología analítica para alimentos y bebidas. 2^a ed. Madrid-España. Díaz de Santos. 2000. p. 13.
69. **PASSALACQUA, Nancy et al.** *Análisis microbiológico de los alimentos metodología, analítica oficial, microorganismos indicadores.* Argentina. 2014. pp. 5-6. Disponible en: http://www.anmat.gov.ar/renaloe/docs/Analisis_microbiologico_de_los_alimentos_Vol_III.pdf
2015/01/30
70. **PÉREZ, Gladys et al.** “Detección de actividad antimicrobiana en bacterias marinas frente a bacterias patógenas humanas”. *Revista VacciMonitor (Vacunología y Temas Afines)*, vol. 8, N° 2, 1999. La Habana-Cuba. pp. 2-7

71. **PREFECTURA PROVINCIAL DE PICHINCHA.** *Plan de desarrollo y ordenamiento territorial de la parroquia Lloa 2012-2025.* Quito-Ecuador. 2012. pp. 7-28. Disponible en: http://www.pichincha.gob.ec/phocadownload/leytransparencia/literal_k/ppot/dmq/ppdot_lloa.pdf.
2015/03/12
72. **PRESCOTT, Lansing; HARLEY, John; & KLEIN, Donald.** *Microbiología.* 3ª ed. Madrid-España. McGraw-Hill. 1996. p. 68.
73. **RESTREPO, Mauricio et al.** “Artritis reactiva asociada con bacteriemia por *Brevundimonas diminuta*”. *Revista Colombiana de Reumatología*, vol. 17, N° 3, 2010. Medellín-Colombia. pp. 245-248. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rcr/v17n4/v17n4a06.pdf>
2015/06/09
74. **RIVERA, Omara.** *Casos de Microbiología clínica. Bacteriemia relacionada con catéter intravascular por Vibrio alginolyticus en un paciente inmunodeprimido.* Cantabria-España 2010. pp. 1-3 Disponible en: http://www.f-soria.es/admf-soria/casos/img/caso_489.pdf
2015/06/12
75. **RIVERA, Pablo.** Análisis para la implementación de las técnicas de determinación de *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* y recuento Heterotrófico en Placa a 22 °C en el Laboratorio Nacional de Aguas del Instituto Costarricense de Acueductos y Alcantarillados, Costa Rica. (TESIS DE MAESTRÍA). Instituto Centroamericano De Administración Pública (ICAP). San José-Costa Rica, 2014, p. 37. Disponible en: http://biblioteca.icap.ac.cr/BLIVI/TESIS/2014/rivera_navarro_pablo_cesar_ca_2014.pdf
2015/06/21
76. **RODRÍGUEZ, Evelyn et al.** *Bacteriología general: principios y prácticas de laboratorio.* San José-Costa Rica. Universidad de Costa Rica. 2005. p. 107.
77. **RODRÍGUEZ, M. J., et al.** *Tratamiento de aguas contaminadas con residuos fenólicos mediante células de C. freundii con actividad tirosinofenolasa.* Coahuila-México. 1997. pp. 1-8. Disponible en: <http://www.bvsde.paho.org/bvsaidis/mexico11/ar-6.pdf>
2015/06/21

78. **RODRÍGUEZ, R et al.** “Precipitación enzimática del cadmio utilizando bacterias nativas del género *Citrobacter*”. *C.T.F Cienc. Tecnol*, vol. 1, N° 1, 1997. Bucaramanga-Colombia. pp. 123-133. Disponible en:
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-53831997000100008
2015/06/01
79. **ROJO, R et al.** “Uso de la amilasa termoestable de *Bacillus licheniformis* en la digestibilidad in vitro del almidón de sorgo y maíz”. *Agrociencia*, vol. 35, N° 4, 2001. Texcoco-México. pp. 423-427.
80. **RUSSO, Gabriel et al.** “Levaduras del Río Agrio y El Lago Caviahue, un ambiente acuático ácido de origen volcánico (Neuquén, Argentina)”. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, vol. 41, N° 3, 2006. Argentina. pp. 167-176. Disponible en:
<http://www.scielo.org.ar/pdf/bsab/v41n3-4/v41n3-4a02.pdf>
2015/04/29
81. **SAENZ PEÑA,** *Antibióticos y Antimicrobianos*. Chaco-Argentina. 1998-2007. Disponible en: <http://www.agrovvetmarket.com/investigacion-salud-animal/pdf-download/antibioticos-y-antimicrobianos>
2015/06/12
82. **SAN MIGUEL DE LA CAMARA, Maximino.** *Geoquímica de las aguas termales*. Madrid-España. Instituto de España de la Real Academia Nacional de Medicina. 1956. pp. 14-19.
83. **SCHOELLER, Herni.** *Les eaux souberraines*. Paris-Francia. Masson. 1962. p. 120.
84. **SEGURIDAD ALIMENTARIA 3M S.A.** *Petrifilm. Guía de interpretación*. Madrid-España. 2009, pp. 1-6; 21-26; 45-48; 65-72. Disponible en:
http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat/workshopmrama/files/Petrifilm_guias.pdf
2015/01/12

85. **SEGURIDAD ALIMENTARIA 3M S.A.** *Análisis de Microorganismos Indicadores*. Madrid-España. 2015. Disponible en:
http://solutions.productos3m.es/wps/portal/3M/es_ES/FoodSafetyEU/FoodSafety/ProductInformation/ProductCatalogue/?PC_Z7_RJH9U5230ODK40IMRSPA7P2O6500000_nid=2BJ86690LFbe8SD7TQV1GLgl
2015/01/23
86. **SIERRA, C.** Calidad del agua, evaluación y diagnóstico. Medellín-Colombia. Universidad de Medellín. 2011. pp. 53; 60
87. **ŠMARDA, Jan.** “Production of bacteriocin-like agents of budvicia aquatica and “Pragia fontium””. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. Series A: Medical Microbiology, Infectious Diseases, Virology, Parasitology*, vol. 265, N° 1. 1987. Czechoslovakia. pp. 74-81.
88. **SNOEYINK, V; & JENKINS, D.** Química del agua. México DF-México. Limusa. 1990. p. 15.
89. **TORTOSA, R.** Termalismo y aguas minero-medicinales en Andalucía: I Simposio del Agua en Andalucía. Andalucía-España. Masson. 1986. pp. 533-538.
90. **ULTEE, A et al.** “Identification of the culturable and nonculturable bacterial population in ground water of a municipal water supply in Germany”. *Journal of applied microbiology*, vol. 96, N° 3, 2004. Germany. pp. 560-568. Disponible en:
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.2004.02174.x/full>
2015/04/05
91. **UNIVERSIDAD DE GRANADA.** *Prácticas Online de Microbiología para Farmacéuticos*. Granada-España. 2015. pp. 1-2. Disponible en:
<file:///C:/Users/Usuario/Downloads/catalasaoxidasa.pdf>
2015/05/24

92. **VALENCIA, Patricio., et al.** Evidencia de transferencia horizontal de genes de resistencia a antibióticos provenientes de bacterias ambientales. (TESIS). Universidad San Francisco de Quito, Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales. Quito-Ecuador. 2009. pp. 12-17 Disponible en:
<http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/1284/1/94455.pdf>
2015/06/20
93. **VENDRELL, M. C et al.** “Estudio De Microorganismos Patógenos En La Fuente Termal De O TINTEIRO EN OURENSE”. *CYTA-Journal of Food*, vol. 2, N° 2, 1998. Vigo-España. pp. 92-95. Disponible en:
<http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/11358129809487587>
2015/06/11
94. **WINFIELD, Mollie,; GROISMAN, Eduardo.** “Role of nonhost environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*”. *Applied and environmental microbiology*, vol. 69, N° 7, 2003. Missouri-United State of America. pp. 3687-3694.
95. **ZAFRA, Irene.** *Aspectos legales de las aguas de bebida envasadas. Panorama actual de las aguas minerales y minero-medicinales en España.* Madrid-España. 2000. pp. 1-14. Disponible en: <http://aguas.igme.es/igme/publica/pdfart3/aspelega.pdf>
2015/01/30
96. **ZARAGOZA, Julián.** Aislamiento de cepas de *Bacillus sp.* Productoras de proteasas con potencial uso industrial. (TESIS de MAESTRÍA). Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Químicas. Nuevo León-México. 2011. pp. 1-7. Disponible en: <http://eprints.uanl.mx/2955/1/1080224404.pdf>
2015/05/04

ANEXOS

Anexo A: Puntos de muestreo



Manantial de lodo medicinal

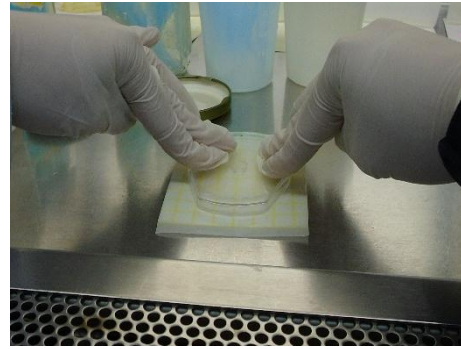


Naciente del afluente termal de la piscina

Anexo B: Siembra en placas Petrifilm



Utilización de cada placa Petrifilm

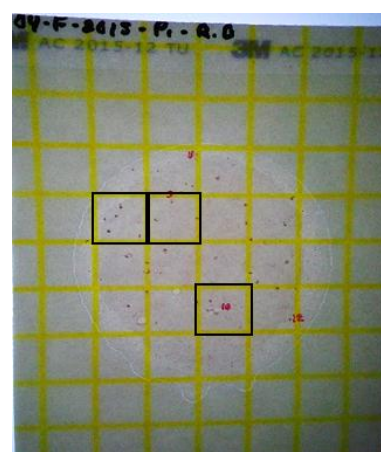


Distribución de las muestras

Anexo C: Recuento de Aerobios mesófilos

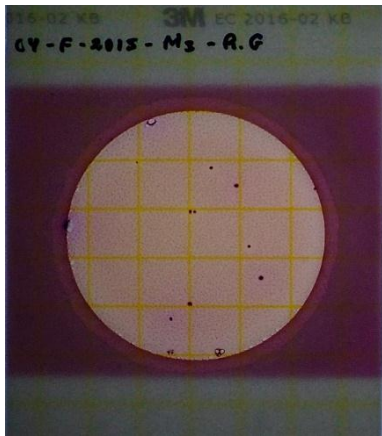


Manantial

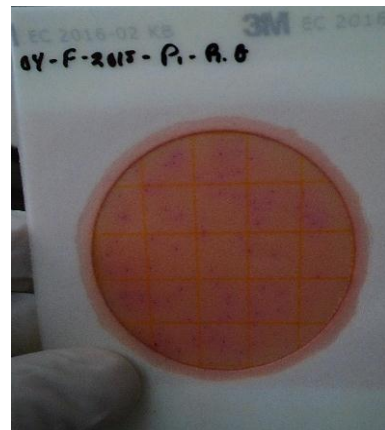


Naciente del afluente termal de la piscina

Anexo D: Recuento de *E. coli*/coliformes

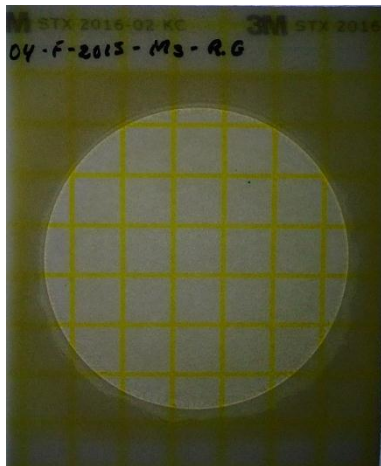


Manantial

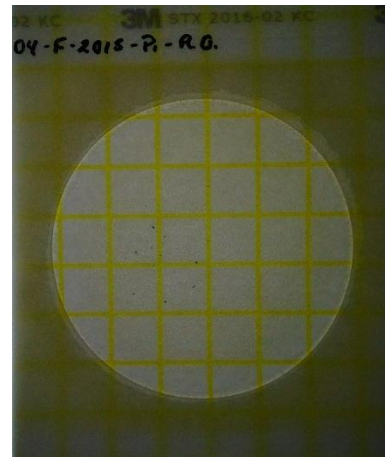


Nacimiento del afluente termal de la piscina

Anexo E: Recuento de Staph Express (*Staphylococcus aureus*)



Manantial



Nacimiento del afluente termal de la piscina

Anexo F: Recuento de Levaduras y Mohos

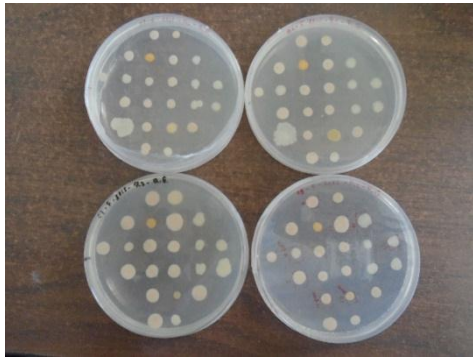


Manantial

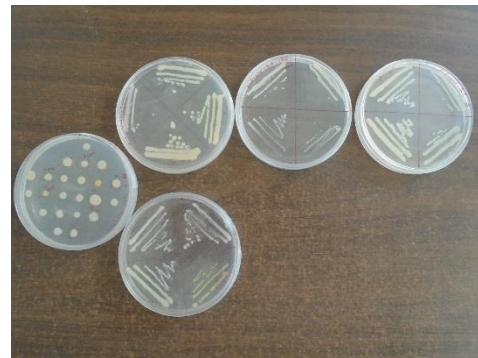


Nacimiento del afluente termal de la piscina

Anexo G: Aislamiento de colonias

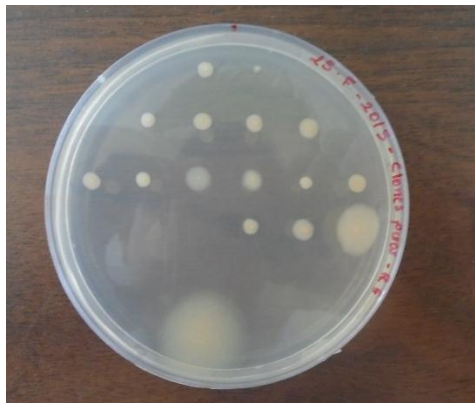


Repiques de colonias aisladas



Siembra por agotamiento

Anexo H: Clones puros



Total de clones puros

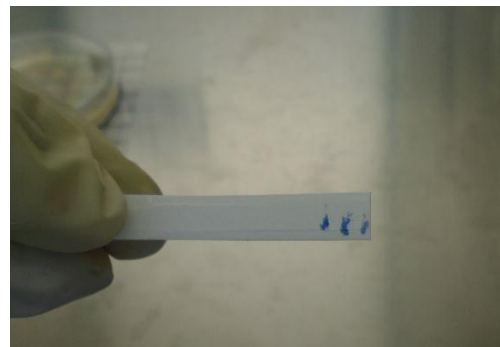


Características morfológicas macroscópicas

Anexo I: Pruebas bioquímicas generales de identificación



Catalasa



Oxidasa

Anexo J: Pruebas bioquímicas generales-específicas de identificación



O/F de Glucosa

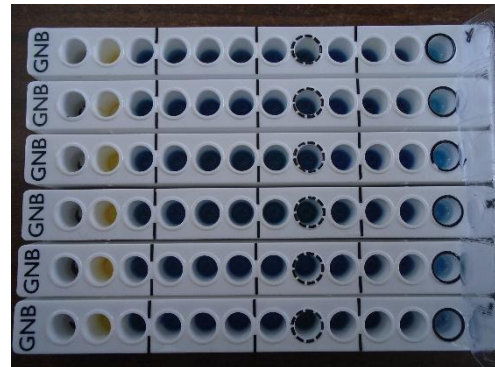


KLIGLER, SIM, UREA Y CITRATO

Anexo K: Sistema de identificación Microgen GNA + B Oxidasa positivo



Galería GNA



Galería GNB

Anexo L: Pruebas bioquímicas para bacilos Gram positivos

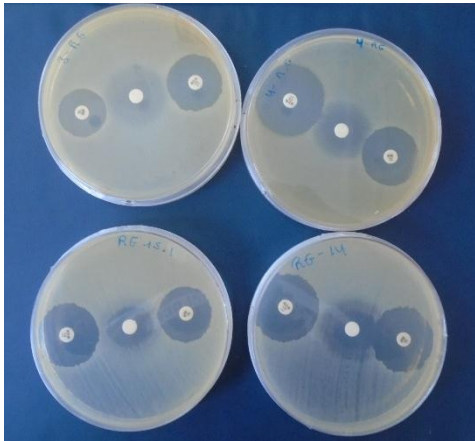


Hidrólisis de Almidón

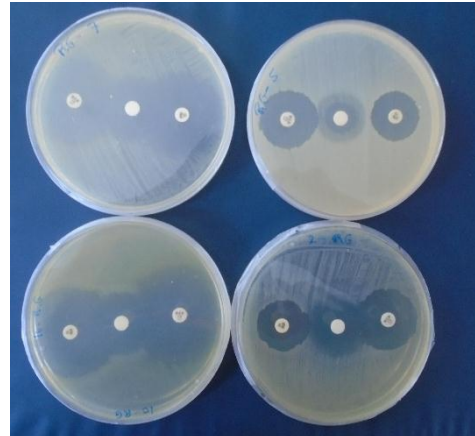


Hidrólisis de Gelatina

Anexo M: Detección de metalo β -lactamasas



Pruebas negativas para metalo β -lactamasas

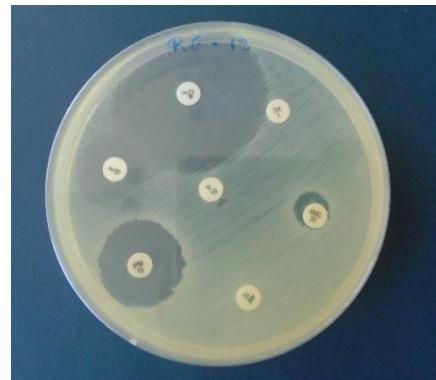


Pruebas negativas para metalo β -lactamasas

Anexo N: Susceptibilidad a antibióticos

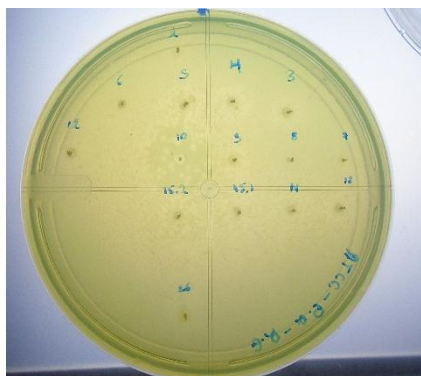


Bacteria con mayor susceptibilidad

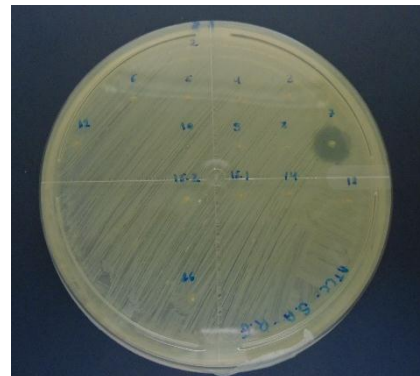


Bacteria con mayor resistencia

Anexo O: Actividad antibacteriana



Evaluación antibacteriana frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853



Evaluación antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* ATCC25923

Anexo P: Ficha de clasificación del manantial natural del balneario Urauco según el INAMHI

Cuenca:	Esmeraldas	H. Topgraf.	Quito	Localidad:	Lloa
Provincia	Pichincha	ESTE (UTM)	763891	Propietario:	Particular
N° :	95	NORTE (UTM)	9974167	Fecha:	28/11/2012
Tipo:	Vert. Termal	Elevación	2773	Uso:	Recreacional
		Proyección:	WGS84	Zona	17 S

ANION	mg/l	CATION	mg/l	OTRAS DETERMINACIONES	
CO3H-	1120,50	Na+	213,15	Parámetros	
CO3=	0,0	K+	26,38	pH	7,2
SO4=	5,5	Ca++	56,10	CE (µs/cm)	2440
Cl-	238,22	Mg++	140,8	DUREZA (mg/l)	719
NO3-	0,20	NH4+	0,000	TEMPERAT (°C)	34,10
NO2	0,050	Fe=	7,3		
PO4=	0,5				
OTRAS DETERMINACIONES					
Turbidez	0		Cobre	0,008	
Color	0		Cromo	0	
Alcalinidad	1120,5		Plomo	0	
STD	1578,68		SiO2	0	
CO2	158,42		Mn	0	
OBSERVACIONES:					
TIPO DE AGUA					
TERMAL					
BICARBONATADA MAGNESICA					

Fuente: INAMHI. 2012

Anexo Q: Ficha de clasificación de la piscina del balneario Urauco según el INAMHI

Cuenca:	Esmeraldas	H. Topgraf.	Quito	Localidad:	Lloa
Provincia	Pichincha	ESTE (UTM)	763891	Propietario:	Particular
N° :	100	NORTE (UTM)	9974167	Fecha:	28/11/2012
Tipo:	Vert. Termal	Elevación	2773	Uso:	Recreacional
		Proyección:	WGS84	Zona	17 S

ANION	mg/l	CATION	mg/l	OTRAS DETERMINACIONES	
CO3H-	1431,70	Na+	415,25	Parámetros	
CO3=	0,0	K+	46,53	pH	7,4
SO4=	5,5	Ca++	72,10	CE (µs/cm)	3440
Cl-	416,89	Mg++	140,8	DUREZA (mg/l)	759
NO3-	0,20	NH4+	0,000	TEMPERAT (°C)	35,70
NO2	0,050	Fe=	0,867		
PO4=	0,5				
OTRAS DETERMINACIONES					
Turbidez	0		Cobre	0,25	
Color	0		Cromo	0	
Alcalinidad	1431,7		Plomo	0	
STD	2225,68		SiO2	0	
CO2	127,62		Mn	0	
OBSERVACIONES:					
TIPO DE AGUA					
TERMAL					
BICARBONATADA SODICA					

Fuente: INAMHI. 2012