



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“ESTUDIO MICROBIOLÓGICO DEL MANANTIAL TERMAL DEL
BALNEARIO “TERMAS LA MERCED” UBICADO EN LA
PARROQUIA LA MERCED PERTENECIENTE A LA PROVINCIA
DE PICHINCHA”**

**Trabajo de titulación presentado para optar al grado académico de:
BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA**

Autora:

CARINA ALEJANDRA NARANJO ZELA

Riobamba – Ecuador

2015



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“ESTUDIO MICROBIOLÓGICO DEL MANANTIAL TERMAL DEL
BALNEARIO “TERMAS LA MERCED” UBICADO EN LA
PARROQUIA LA MERCED PERTENECIENTE A LA PROVINCIA
DE PICHINCHA”**

**Trabajo de titulación presentado para optar al grado académico de:
BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA**

Autora: CARINA ALEJANDRA NARANJO ZELA

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 DEL MANANTIAL TERMAL DEL BALNEARIO “TERMAS LA MERCED” UBICADO EN LA PARROQUIA LA MERCED PERTENECIENTE A LA PROVINCIA DE PICHINCHA**”, de responsabilidad de la señorita Carina Alejandra Naranjo Zela, 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 DE TRIBUNAL

DOCUMENTALISTA
SISBIB ESPOCH

NOTA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Carina Alejandra Naranjo Zela, 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.

CARINA ALEJANDRA NARANJO ZELA

DEDICATORIA

El presente trabajo de tesis quiero dedicar a Dios por brindarme la oportunidad de vivir, compartir con él mis alegrías y tristezas, por ser mi guía en los momentos difíciles, por brindarme su apoyo, escucharme y levantarme de mis derrotas, ser mi fortaleza para seguir adelante.

A mis padres por brindarme su infinito amor, comprensión y sabios consejos a lo largo de mi camino, ser un ejemplo de constancia, perseverancia, sacrificio y por sus valiosas enseñanzas.

A mis segundos padres Agustín y Olguita por ser un ejemplo a seguir, por sus palabras, amor y paciencia.

A mis hermanas Ariana y Karla por su cariño, ser mis amigas en buenos y malos momentos, por darme siempre su apoyo incondicional a lo largo de mi vida.

Carina

AGRADECIMIENTO

A Dios por guiarme en el camino de la excelencia y del saber, por ser mi compañero en los momentos difíciles y en los de éxito.

Al Templo del saber la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, a la Escuela de Bioquímica y Farmacia, en especial a mis Docentes que me han guiado y me han hecho crecer profesionalmente gracias por los conocimientos impartidos a lo largo de mi formación académica.

A mi familia que ha estado siempre apoyándome en mis triunfos y derrotas, ser el pilar fundamental en mí, por inculcarme valores. Mil Gracias.

Al Dr. Gerardo Medina por ser un excelente profesor, sabiendo guiarme con sus conocimientos hacia un futuro mejor, gracias por ser un amigo incondicional durante todo mi trabajo de tesis.

Al Dr. Félix Andueza por su valiosa colaboración y conocimientos que ayudaron para que este trabajo de investigación tenga buenos resultados.

Al Ing. Miguel García y Sr. Jorge Vitatuña por haberme dado la oportunidad de realizar mi trabajo de investigación en el Balneario “Termas La Merced”.

A mis amigas y amigos con quien compartí gratos momentos, a las Doctoras Isabelita, Paty, Aidita y a todas las personas que de alguna manera especial aportaron con su colaboración para la realización de mi trabajo de investigación.

Carina

TABLA DE CONTENIDO

CONTENIDO	Páginas
RESUMEN.....	xv
SUMMARY.....	xvi
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I	
1. MARCO TEORICO	3
1.1. Agua	3
1.1.1. <i>Generalidades Del Agua</i>	3
1.2. Agua Termo-Minerales	3
1.2.1. Definición	3
1.2.2. Clasificación de las Aguas Termo-Minerales	4
1.2.2.1. <i>Dependiendo de su temperatura</i>	5
1.2.2.2. <i>Dependiendo del origen geológico</i>	5
1.2.2.3. <i>Dependiendo de su residuo seco a 110°C</i>	6
1.2.2.4. <i>Dependiendo la relación del pH</i>	6
1.2.2.5. <i>Dependiendo de su composición química</i>	7
1.3. Usos terapéuticos	7
1.3.1. Aguas bicarbonatadas	7
1.3.2. Aguas cloruradas	8
1.3.3. Agua ferruginosas	8
1.3.4. Aguas sulfuradas	8
1.3.5. Aguas sulfatadas	8
1.3.6. Aguas radioactivas	9
1.4. Aguas Minero-Medicinales Balneario “Termas La Merced”	9
1.4.1. Parroquia La Merced	9
1.4.2. Balneario “Termas La Merced”	10
1.4.2.1. <i>Descripción</i>	10
1.4.2.2. <i>Localización</i>	10
1.5. Parámetros Físico-Químicos	11
1.5.1. Temperatura	11
1.5.2. pH	12
1.5.3. Color	12
1.5.4. Olor	12

1.6.	Microbiología de las Aguas Minero-Medicinales	12
1.6.1.	<i>Microorganismos Autóctonos</i>	12
1.6.2.	<i>Microorganismos Alóctonos</i>	13
1.7.	Indicadores Microbianos de la Calidad de las Aguas Termo- Minerales	14
1.7.1.	<i>Aerobios Mesófilos</i>	14
1.7.2.	<i>Coliformes totales</i>	14
1.7.3.	<i>Coliformes fecales</i>	14
1.7.4.	<i>Mohos y levaduras</i>	15
1.7.5.	<i>Staphylococcus aureus</i>	15
1.8.	Métodos de Identificación Bacteriana	15
1.8.1.	<i>Placas Petrifilm</i>	15
1.8.2.	<i>Cultivo de Microorganismos</i>	18
1.8.2.1.	<i>Medios de cultivo</i>	18
1.8.2.1.1	<i>Condiciones de los medios de cultivo</i>	19
1.8.2.1.2	<i>Utilidad de los medios de cultivo</i>	19
1.8.2.1.3	<i>Clasificación de los medios de cultivo según su capacidad de crecimiento</i>	19
1.8.2.1.4	<i>Composición de los medios de cultivo</i>	20
1.8.3	<i>Características Macroscópicas</i>	20
1.8.4	<i>Tinción diferencial de Gram</i>	21
1.8.5	<i>Características Microscópicas</i>	22
1.9.	Pruebas Bioquímicas	22
1.9.1.	<i>Catalasa</i>	22
1.9.2.	<i>Oxidasa</i>	23
1.9.3.	<i>Oxidación/Fermentación</i>	23
1.9.4.	<i>Agar hierro de Kligler</i>	24
1.9.5.	<i>Utilización del citrato</i>	25
1.9.6.	<i>Medio SIM</i>	25
1.9.7.	<i>Ureasa</i>	26
1.9.8.	<i>Hidrólisis del almidón</i>	27
1.9.9.	<i>Hidrólisis de la gelatina</i>	27
1.10.	Galerías multipruebas (Microgen TM)	28
1.11.	Pruebas de Resistencia antibiótica	29
1.11.1	<i>Antibiograma</i>	29
1.11.1.1	<i>Difusión en agar</i>	29

1.12.	<i>Enzima metalo-β-lactamasas</i>	30
1.13.	Géneros de las bacterias encontradas en el Estudio Microbiológico	31
CAPITULO II		
2.	MARCO METODOLÓGICO	32
2.1.	Parte Experimental	32
2.2.	Diseño del Estudio Microbiológico	32
2.1.1	<i>Características del Lugar de Investigación</i>	32
2.1.2	<i>Factores de Estudio</i>	32
2.1.3	<i>Manejo Específico del Estudio</i>	32
2.1.3.1	<i>Lugar del muestreo</i>	32
2.1.3.2	<i>Lugar y pruebas de ensayo</i>	33
2.2	Materiales, equipos y reactivos	33
2.3	Métodos y Técnicas	35
2.3.1	<i>Muestreo</i>	35
2.3.1.1	<i>Toma de muestra</i>	35
2.3.2	<i>Registro</i>	35
2.3.3	<i>Determinación de parámetros in situ</i>	36
2.3.4	<i>Conservación y transporte de la muestra</i>	36
2.3.5.	<i>Análisis en el laboratorio</i>	36
2.3.5.1	<i>Método Petrifilm</i>	36
2.3.5.2	<i>Descripción macroscópica de las colonias</i>	37
2.3.5.3	<i>Estabilización del aislado bacteriano</i>	38
2.3.5.4	<i>Tinción Gram del aislado bacteriano puro</i>	39
2.3.5.5	<i>Pruebas bioquímicas del aislado bacteriano puro</i>	39
2.3.5.6	<i>Esquemas del estudio microbiológico con cada una de las identificaciones de las bacterias encontradas en el estudio</i>	42
2.3.5.7	<i>Pruebas de resistencia antibiótica</i>	47
2.3.5.8	<i>Prueba de antibiograma con EDTA</i>	48
2.3.5.9	<i>Ensayo de actividad antibacteriana</i>	48
2.3.5.10	<i>Identificación de las colonias bacterianas puras por medio de las galerías de MicrogenTM</i>	48
CAPITULO III		
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
3.1	<i>Parámetros In-situ</i>	49
3.2	<i>Recuento Bacterias Aerobias Mesófilas</i>	50

3.3	<i>Recuento de E. coli / Coliformes totales</i>	53
3.4	<i>Recuento de Staphylococcus aureus</i>	55
3.5	<i>Recuento de Mohos y levaduras</i>	56
3.6	<i>Morfología macroscópica de los clones aislados</i>	58
3.7	<i>Número de clones puros aislados</i>	59
3.8	<i>Resultado de las pruebas bioquímicas de los aislados puros</i>	61
3.9	<i>Especies bacterianas identificadas</i>	63
3.10	<i>Susceptibilidad a los antibióticos</i>	66
3.11	<i>Resultados Presencia de metalo-β-lactamasa</i>	69
3.12	<i>Resultados de la actividad antimicrobiana</i>	70
	CONCLUSIONES	71
	RECOMENDACIONES	73
	BIBLIOGRAFÍA	
	ANEXOS	

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

Cm	Centímetro
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EMB	Eosina azul de metileno
ESPOCH	Escuela Superior Politécnica de Chimborazo
G	Gramos
h.	Hora
Ha	Hasta la actualidad
INAMHI	Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología
INEN	Instituto Ecuatoriano de Normalización
Km	Kilómetros
L	Litro
M	Metro
Mg	Miligramos
mL	Mililitro
msnm	Metros sobre el nivel del mar
NTE	Normas Técnicas Ecuatorianas
pH	Potencial de hidrógeno
SIM	Sulfhídrico Indol Movilidad
STD	Sólidos totales disueltos
TSI	Agar Triple Azúcar
U	Unidades
µg	Microgramo
UFC	Unidades formadoras de colonias
µL	Microlitro
µs	MicroSiemens
UTM	Sistema de Coordenadas Universal Transversal de Mercator (Universal Transverse Mercator)
%	Porcentaje
°C	Grados Celsius

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-3	Resultado de las determinaciones de los parámetros in-situ en el manantial termal del balneario “Termas La Merced”	49
Tabla 2-3	Resultado del recuento de Bacterias aerobias mesófilas (UFC/mL) en el manantial termal del balneario “Termas La Merced”	50
Tabla 3-3	Resultado del recuento de <i>E. coli</i> /Coliformes (UFC/mL) del manantial termal del balneario “Termas La Merced”	53
Tabla 4-3	Resultado del recuento de Mohos y levaduras (UFC/mL) en el manantial termal del balneario “Termas La Merced”	56
Tabla 5-3	Características de las bacterias aisladas del manantial termal del balneario “Termas La Merced”	58
Tabla 6-3	Clones aislados en el manantial termal del balneario “Termas La Merced”	59
Tabla 7-3	Pruebas Bioquímicas del clon aislado (Bacilo Gram positivo del manantial termal del balneario “Termas La Merced”	61
Tabla 8-3	Pruebas Bioquímicas de los clones aislados (Bacilos Gram negativos del manantial termal del balneario “Termas La Merced”	62
Tabla 9-3	Clones aislados del manantial termal del balneario “Termas La Merced.....	63
Tabla 10-3	Antibiograma de Bacilos Gram negativos del manantial termal del balneario “Termas La Merced”	66
Tabla 11-3	Antibiograma de Bacilo Gram positivo del manantial termal del balneario “Termas La Merced”	68
Tabla 12-3	Resultados de la prueba antibiograma con EDTA con bacterias del manantial termal del balneario “Termas La Merced”	69
Tabla 13-3	Actividad antibacteriana de clones aislados e identificados procedentes del manantial termal del balneario “Termas La Merced”	70

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1-1	Clasificación dependiendo de su temperatura.....	5
Cuadro 2-1	Clasificación dependiendo de su origen geológico.....	5
Cuadro 3-1	Clasificación dependiendo de su residuo seco.....	6
Cuadro 4-1	Clasificación dependiendo al pH según Norma Cubana.....	6
Cuadro 5-1	Usos terapéuticos aguas bicarbonatadas.....	8
Cuadro 6-1	Usos terapéuticos aguas sulfatadas.....	9
Cuadro 7-1	Procedimiento de siembra en placas petrifilm.....	16
Cuadro 8-1	Incubación en placas petrifilm.....	17
Cuadro 9-1	Interpretación de resultados de las placas petrifilm.....	17
Cuadro 10-1	Tipo de Petrifilm a usarse en el estudio.....	17
Cuadro 11-1	Requerimientos de los microorganismos en los medios de cultivo.....	18
Cuadro 12-1	Clasificación según su capacidad de crecimiento.....	19
Cuadro 13-1	Términos usados.....	22
Cuadro 14-1	Géneros de bacterias con sus características.....	31
Cuadro 1-2	Materiales, equipos y reactivos de laboratorio.....	34
Cuadro 2-2	Datos en el informe de muestreo.....	35

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-1	Recuento de Bacterias Aerobias Mesófilas del manantial termal del balneario “Termas La Merced”	51
Gráfico 2-1	Recuento de <i>E. coli</i> /Coliformes totales del manantial termal del balneario “Termas La Merced”	54
Gráfico 3-1	Recuento de Mohos y Levaduras del manantial termal del balneario “Termas La Merced”	57
Gráfico 4-1	Número de clones aislados del manantial termal del balneario “Termas La Merced”	59
Gráfico 5-1	Identificación de Bacterias aisladas del manantial termal del balneario “Termas La Merced”	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1	Aguas termo-minerales.....	4
Figura 2-1	Clasificación general de las aguas termo-minerales.....	4
Figura 3-1	Clasificación dependiendo su composición química.....	7
Figura 4-1	Mapa de Ubicación del Balneario “Termas La Merced”.....	11
Figura 5-1	Diferencias de la pared celular de las bacterias Gram positivas y Gram negativas.....	21
Figura 6-1	Prueba Bioquímica Catalasa.....	23
Figura 7-1	Prueba Bioquímica Oxidasa.....	23
Figura 8-1	Prueba Bioquímica O/F.....	24
Figura 9-1	Prueba Bioquímica Kligler.....	24
Figura 10-1	Prueba Bioquímica Citrato.....	25
Figura 11-1	Prueba Bioquímica SIM (Producción de H ₂ S).....	25
Figura 12-1	Prueba Bioquímica SIM (Indol).....	26
Figura 13-1	Prueba Bioquímica SIM (Movilidad).....	26
Figura 14-1	Prueba Bioquímica Ureasa.....	26
Figura 15-1	Prueba Hidrólisis del Almidón.....	27
Figura 16-1	Prueba Hidrólisis de la Gelatina.....	27
Figura 17-1	Galerías Microgen™.....	28
Figura 18-1	Realización del Antibiograma.....	30
Figura 1-2	Siembra en Placas Petrifilm™.....	37
Figura 2-2	Descripción macroscópica.....	38
Figura 3-2	Siembra por agotamiento.....	38
Figura 4-2	Realización de la Tinción Gram.....	39
Figura 5-2	Diagrama metodológico del Estudio Microbiológico.....	42

Figura 6-2	Diagrama metodológico de Clones Aislados (Colonias puras).....	42
Figura 7-2	Diagrama metodológico de Identificación de Bacterias Gram Positivas, Género (<i>Bacillus spp.</i>).....	43
Figura 8-2	Diagrama metodológico de Identificación de Bacterias Gram Negativas, Género y especie (<i>Acinetobacter haemolyticus</i>).....	43
Figura 9-2	Diagrama metodológico de Identificación de Bacterias Gram Negativas, Género y especie (<i>Brevundimonas diminuta</i>).....	44
Figura 10-2	Diagrama metodológico de Identificación de Bacterias Gram Negativas, Género y especie (<i>Aeromonas schubertii</i>).....	44
Figura 11-2	Diagrama metodológico de Identificación de Bacterias Gram Negativas, Género y especie (<i>Budvicia aquatica</i>).....	45
Figura 12-2	Diagrama metodológico de Identificación de Bacterias Gram Negativas, Género y especie (<i>Xenorhabdus beddingii</i>).....	45
Figura 13-2	Diagrama metodológico de Identificación de Bacterias Gram Negativas, Género y especie (<i>Citrobacter amalonaticus</i>).....	46
Figura 14-2	Diagrama metodológico de Identificación de Bacterias Gram Negativas, Género y especie (<i>Pseudomonas stutzeri</i>).....	46
Figura 15-2	Procedimiento por el Método difusión en agar.....	47

ÍNDICE DE FOTOGRAFIAS

Fotografía 1	Punto de muestreo (Pozo).....	33
Fotografía 2	Punto de muestreo (Piscina).....	33

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A	Ficha de clasificación del Balneario “Termas La Merced”
ANEXO B	Balneario “Termas La Merced”
ANEXO C	Puntos de la toma de muestra para el Estudio Microbiológico
ANEXO D	Medición de parámetros in-situ (multiparámetro HANNA)
ANEXO E	Siembra por el método de petrifilm en las muestras de la piscina y del pozo.
ANEXO F	Resultados del recuento de bacterias de la piscina como del pozo a las 24 horas, a una temperatura de 35°C.
ANEXO G	Resultados del recuento de bacterias de la piscina como del pozo a las 48 horas, a una temperatura de 35°C.
ANEXO H	Resultados del recuento de mohos y levaduras a los 7 días de la piscina y del pozo, a una temperatura de 25°C.
ANEXO I	Colonias que se usaran para los repiques
ANEXO J	Resultado de repiques de la piscina
ANEXO K	Estrías de las colonias de la piscina
ANEXO L	Clones aislados puros
ANEXO M	Tinción Gram de los clones aislados puros
ANEXO N	Prueba de la catalasa y oxidasa a clones puros
ANEXO O	Pruebas para la identificación de Bacilos Gram Positivos
ANEXO P	Pruebas para la identificación de Bacilos Gram Negativos
ANEXO Q	Pruebas bioquímicas Bacilos Gram Negativos
ANEXO R	Sistema Comercial Microgen TM
ANEXO S	Antibiogramas de las especies identificadas
ANEXO T	Antibiograma con EDTA
ANEXO U	Actividad Antibacteriana de los clones aislados

RESUMEN

El presente trabajo de investigación fue realizado en muestras de aguas termales obtenidas del Balneario “Termas La Merced”, ubicado en la Provincia de Pichincha. Mediante este estudio microbiológico se podrá diagnosticar la calidad sanitaria, el estudio tiene como objetivo caracterizar e identificar la diversidad microbiana que pudieran poner en riesgo a la salud de los bañistas. El aislamiento de las bacterias presentes se realizó por el método de placas Petrifilm™: para bacterias aerobias mesófilas, *Escherichia coli* y coliformes, *Staphylococcus aureus*, mohos y levaduras. Se logró aislar 21 cepas bacterianas. Para la identificación de género y especie, se realizaron pruebas bioquímicas dando como resultado la identificación de 11 cepas y 2 cepas se las identificó empleando el sistema de identificación Microgen™. Las especies encontradas fueron *Brevundimonas diminuta*, *Citrobacter amalonaticus*, *Aeromonas schubertii*, *Budvicia aquatica*, *Xenorhabdus beddingii*, *Acinetobacter haemolyticus* y *Pseudomonas stutzeri*. Con respecto a la bacteria Gram positiva aislada pertenece a bacilo Gram positivo, corresponde al género *Bacillus*. Se realizaron estudios de susceptibilidad antibacteriana a las 13 cepas identificadas, por el método de Kirby Bauer, donde se observó que la gran mayoría de cepas fueron sensibles a la mayoría de los antibióticos utilizados. Finalmente por el método de difusión de agar se evaluó la capacidad antibacteriana de las cepas aisladas, frente a diferentes cepas ATCC (American Type Colony Characteristic), donde se observó que las especies *Brevundimonas diminuta*, *Budvicia aquatica* y el género *Bacillus spp.* inhibieron el crecimiento sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Las muestras analizadas contienen una población bacteriana heterótrofa diversa, sin embargo la necesidad de realizar estudios periódicos y exhaustivos que controlen la calidad sanitaria para evitar riesgos de brotes de infecciones bacterianas en los bañistas.

PALABRAS CLAVE: <BALNEARIO “TERMAS LA MERCED”> <AGUAS BICARBONATADAS MAGNÉSICAS> <AGUAS TERMALES> <MICROBIOTA AUTÓCTONA> <MICROORGANISMOS MESÓFILOS> <CLONES PUROS> <ANTIBIOGRAMA> <INDICADORES BACTERIANOS> < PARÁMETROS FISICO-QUÍMICOS>

SUMMARY

This research was carried out for samples of thermal water obtained from of "Termas La Merced" hot springs located in Pichincha Province. By means of a microbiological study, it will be possible to diagnose the sanitary quality of the water. The principal objective of the research is to characterize and identify the microbial diversity which would risk the bathers health. The isolation of bacteria that are present was carried out by means of Petrifilm™ plate method for: aerobic mesophilic bacteria, *Escherichia coli* and coliforms, *Staphylococcus aureus*, molds and yeasts. It was isolated 21 bacterial strains. For gender and specie identification, biochemical tests resulting in 11 strains were carried out, and two strains were identified by using Microgen™ identification system. The species found were *Brevundimonas diminuta*, *Citrobacter amalonaticus*, *Aeromonas schubertii*, *Budvicia aquatica*, *Xenorhabdus beddingii*, *Pseudomonas stutzeri* and *Acinetobacter haemolyticus*. With respect to the positive isolated Gram bacterium belonging to Gram-positive *Bacillus*. The antibacterial susceptibility study for the 13 identified strains was carried out by means of Kirby Bauer method where it was showed that most strains were sensible to the antibiotics used. By means of Agar diffusion method the antibacterial capacity of isolated strains was finally evaluated. Related to different ATCC (American Type Colony Characterustucs) strains where *Brevundimonas diminuta*, *Budvicia aquatica* and *Bacillus spp.* gender species inhibited their growth over *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. The samples studied contain a diverse heterotroph bacterial population, however there is necessity to carry out periodical deep studies wich control the sanitary quality to avoid the risk of bacterial infections on bathers.

KEY WORDS: <TERMAS LA MERCED" HOT SPRINGS> <MAGNESIC BICARBONATED WATERS> <HOT SPRINGS> <NATIVE MICROBIOTA> <MESOFILIC MICROORGANISMS> <PURE CLONES> <ANTIBIOGRAM> <BACTERIAL INDICATORS > <PHYSICAL-CHEMICAL PARAMETERS>

INTRODUCCIÓN

La utilización de las aguas minerales y termales, es una forma muy antigua de tratamiento de las enfermedades, pues hace más de 2000 años empezaron a aplicarse por vía oral o en forma de baños por sus propiedades terapéuticas. (DE LA ROSA & MOSSO, 2004)

“Cada una de las aguas minero medicinales, termales o no, tienen características propias físicas y químicas, así como también microbiológicas, que le confieren un “perfil”, una especificidad que a su vez determina sus propiedades y por tanto sus aplicaciones”. (DE LA ROSA & MOSSO, 2004)

En el Ecuador por su ubicación dentro del Círculo de Fuego del Pacífico, se ha documentado que existen 167 manantiales de aguas termales y minerales, ubicados principalmente en el callejón Interandino, la utilización de este tipo de aguas es muy frecuente en el país por sus propiedades terapéuticas.

Los manantiales de aguas termales son hábitats extremos ya que presentan altas temperaturas, mayor cantidad de concentración de sales las cuales son condiciones no favorables para el desarrollo de la vida de algunos seres vivos. Sin embargo, desde hace algún tiempo atrás se conoce que estas aguas, como cualquier ambiente acuático natural poseen una población microbiana autóctona que suele ser característica de cada tipo de manantial y que depende de sus propiedades físico-químicas (temperatura, pH y composición mineral, etc.)

El presente trabajo tiene como objeto el Estudio microbiológico del manantial termal del Balneario “Termas La Merced” ubicado en la parroquia La Merced perteneciente a la provincia de Pichincha, con el propósito de caracterizar e identificar la diversidad microbiana para de esta manera conocer los microorganismos que pudieran poner en riesgo la salud de los usuarios del Balneario, ya que estas aguas son usadas por los beneficios medicinales que brindan para afecciones como la dermatosis, los problemas reumáticos, post-operatorios, entre otras

Tomando en consideración lo antes señalado, uno de los propósitos en este trabajo es de aislar e identificar los microorganismos que habitan en el manantial termal del Balneario Termas La Merced ubicado en la parroquia La Merced, perteneciente a la Provincia de Pichincha, con la finalidad de determinar la presencia de microorganismos con posibles actividades biológicas antimicrobianas, fúngicas y enzimáticas importantes desde un punto de vista farmacéutico y biotecnológico.

El aislamiento e identificación de los microorganismos que habitan en el manantial termal “Termas La Merced”, se realizó por medio del método de petrifilm, posteriormente utilizamos medio de cultivo Mueller Hinton para la obtención de cultivos puros. A las colonias aisladas se les realizaron pruebas bioquímicas y para determinar la identidad de los aislados se utilizó las galerías Microgen TM. Adicionalmente se realizaron pruebas de resistencia a diferentes antibióticos de las cepas aisladas, empleando el método de difusión en agar.

Como este balneario es usado para fines recreacionales y terapéuticos, estas aguas son utilizadas por niños, ancianos y adultos, todas estas personas son vulnerables a los diferentes microorganismos que viven en estos hábitats y más aún cuando su sistema inmune está disminuido. Por lo tanto es importante realizar estudios que permitan determinar si existe algún tipo de resistencia a los antibióticos, para que de esta manera ya no exista un porcentaje representativo de resistencias antimicrobianas dadas por microorganismos que se encuentran en este tipo de manantiales.

En el Ecuador el Plan Nacional del Buen Vivir en el objetivo número 3 busca garantizar condiciones favorables tanto en la salud como en la prevención de enfermedades que aseguren el mejoramiento de la calidad de vida. De igual manera en el objetivo 7 los ciudadanos tienen derecho a vivir en un ambiente sano, libre de contaminación y mediante estos objetivos se garantiza el derecho humano a vivir en un ambiente sano, pilar fundamental en la sociedad del Buen Vivir. Por este motivo mediante el estudio microbiológico se evaluará la calidad del agua teniendo en cuenta que el agua es un vehículo para la transmisión de enfermedades por lo que se hará un estudio exhaustivo de microorganismos patógenos que pudieran ocasionar daños a los usuarios ya que cada balneario presenta una calidad única tanto en sus propiedades como en sus parámetros higiénico-sanitarios.

El Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología (INAMHI) han desarrollado estudios con la finalidad de investigar los parámetros físico-químicos (pH, temperatura, conductividad eléctrica y composición iónica), para el mejoramiento y optimización de la preservación de las aguas termo-minerales.

Mediante este estudio pionero se podrá diagnosticar la calidad sanitaria del balneario y de esta manera poder descartar la presencia de microorganismos patógenos.

CAPITULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Agua

1.1.1 Generalidades Del Agua

El agua es un componente que se encuentra en la Tierra hace más de 3.000 millones de años, ocupando tres cuartas partes de la superficie del planeta. Se compone de tres átomos, dos de oxígeno que unidos entre sí forman una molécula de agua, H₂O. La forma en que estas moléculas se unen entre sí determinará la forma en que encontramos el agua en nuestro entorno; como líquido (lluvias, ríos, océanos, etc.), como sólidos (hielo, nieve) o como gas en las nubes. (FAGUNDO, J; et al, 1999)

1.2 Aguas Termo-Minerales

1.2.1 Definición

Armijo & San Martin en 1994, definen al agua termo-mineral como aquellas que ascienden desde el interior de la tierra y llegan a la superficie, en forma natural como vertientes, o a través de pozos perforados y que, por sus características físicas y químicas, pueden ejercer efectos terapéuticos para aliviar o restaurar la salud de las personas.

Para que las aguas reciban la denominación de termo minerales, deben cumplir por lo menos, una de las siguientes características: (ARMIJO & SAN MARTIN, 1994)

- Temperatura en la fuente mayor a 20°C, o superior en 5°C a la temperatura media anual del lugar en el que emergen;
- Contenido total de sólidos disueltos mayor que 1g/L. Las especies químicas que asignan el nombre para su clasificación (cloruradas, bicarbonatadas, sulfatadas, etc.).



Figura 1-1. Aguas termo- minerales
Fuente: Balneario “Termas La Merced”, 2012

1.2.2 Clasificación de las Aguas Termo-Minerales

El criterio de clasificación de las aguas termo-minerales puede ser asumido desde diversos puntos de vista: físico-químico, de acuerdo a la temperatura, a su origen geológico, etc.

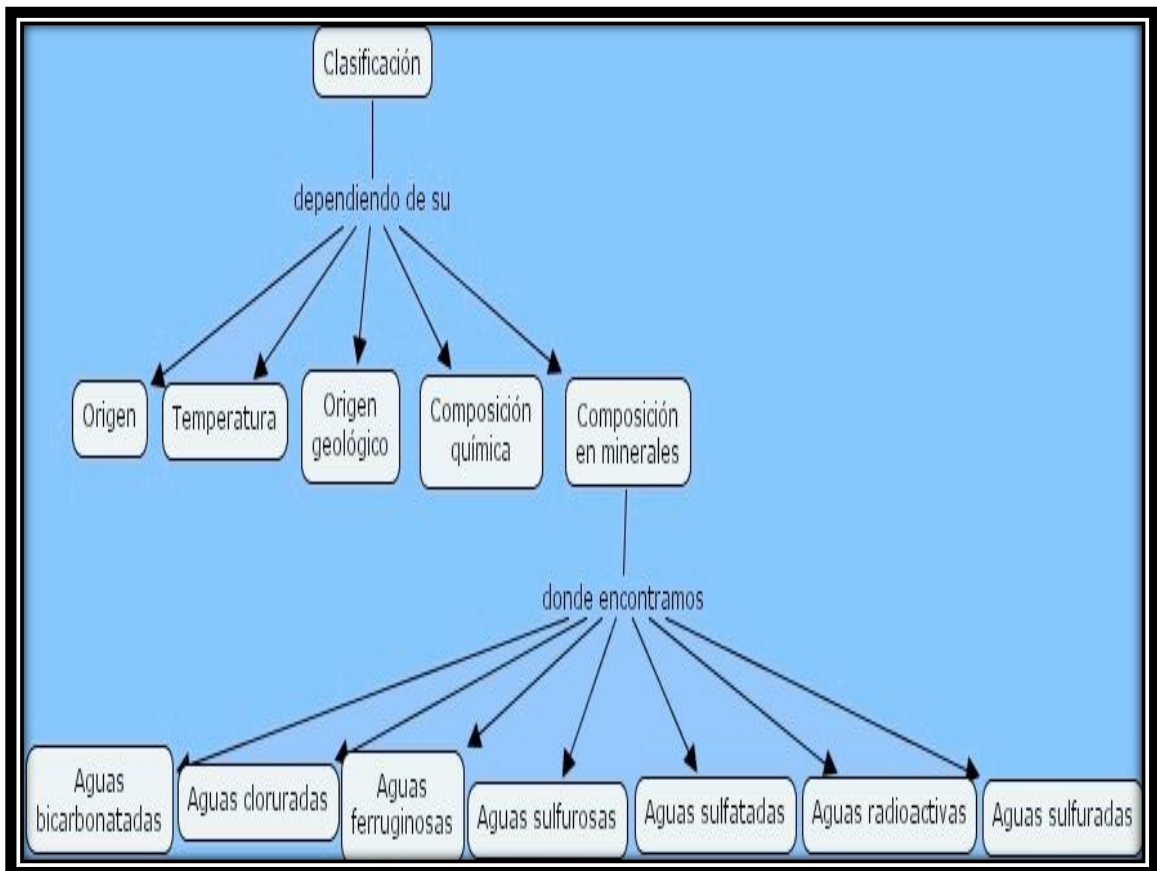


Figura 2-1. Clasificación general de las aguas termo-minerales
Fuente: ARMIJO, M & SAN MARTIN, J. 1994

La clasificación más sencilla es considerar aquella en que su aplicación no produce sensación de frío ni de calor que, con las variaciones de sensibilidad individual, se admite que es la comprendida entre 34 y 36 °C. Las aguas que presentan estas temperaturas se denominan mesotermiales, considerándose hipertermiales o hipotermiales aquellas que estén por encima o por debajo de dicho margen. (ARMIJO & SAN MARTIN, 1994)

1.2.2.1 Dependiendo de su temperatura

De acuerdo a Armijo M, San Martín J, (1994) las clasifica como:

Cuadro 1-1: Clasificación dependiendo de su temperatura

Frías: menos de 20°C
Hipotermiales: 20 - 30°C
Mesotermiales: 30 - 40°C
Hipertermiales: más de 40°C

Fuente: ARMIJO & SAN MARTIN, 1994

1.2.2.2 Dependiendo de su origen geológico

Según Abalnearios, (1999) las aguas se clasifican como:

Cuadro 2-2 Clasificación dependiendo de su origen geológico

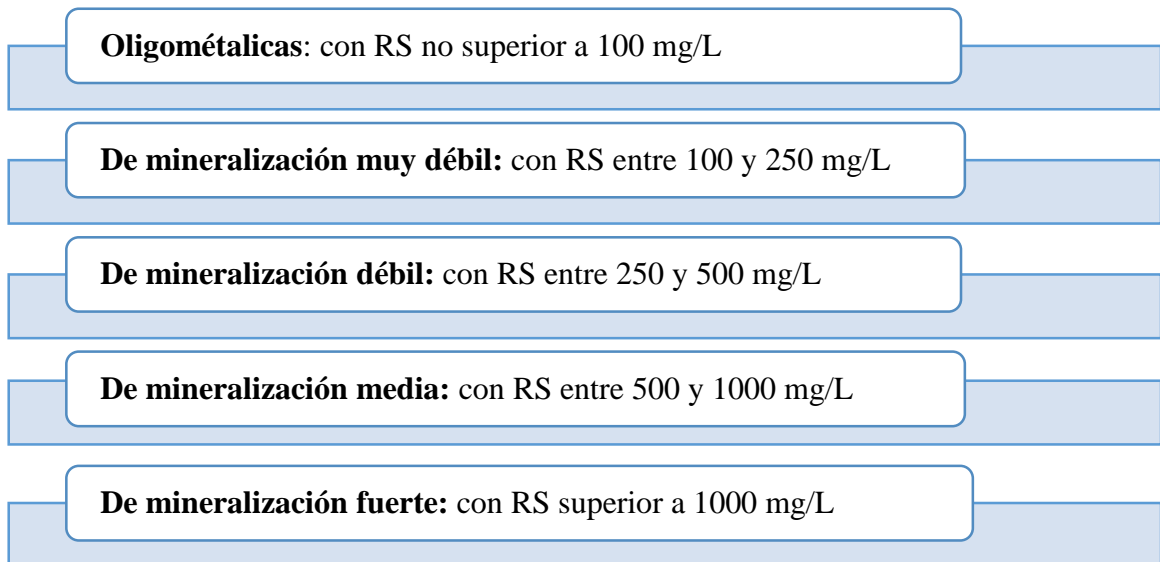
Aguas magmáticas: Este tipo de aguas son de carácter eruptivo, de caudal constante tanto en su composición y temperatura.
Aguas telúricas: El caudal varía según la época del año, ya que este tipo de aguas proviene de la infiltración de las lluvias.

Fuente: Abalnearios, 1999

1.2.2.3 Dependiendo de su residuo seco a 110°C

De acuerdo a su mineralización global, es decir el total de sólidos disueltos, se han dividido a las aguas termo-minerales atendiendo al residuo seco (RS) a 110°C. (MARAVÉR y col, 2003)

Cuadro 3-1. Clasificación dependiendo de su residuo seco

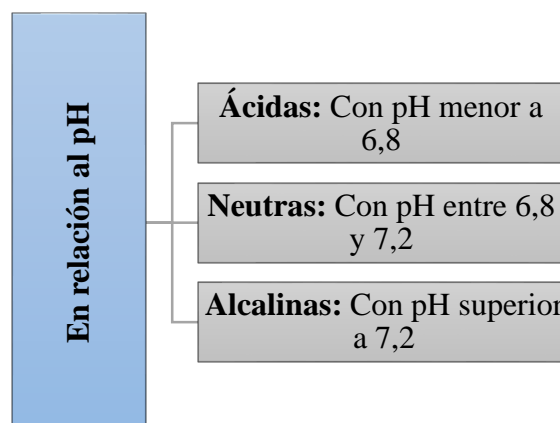


Fuente: MARAVÉR y col, 2003

1.2.2.4 Dependiendo la relación del pH

En base a la Norma Cubana de Agua Mineral (NC 93-01-218:1995) las aguas pueden clasificarse en:

Cuadro N° 4-1: Clasificación dependiendo pH según Norma Cubana



Fuente: (FAGUNDO, 2007)

1.2.2.5 Dependiendo de su composición química

Cuando las aguas termales tienen más de un gramo por litro de mineralización global, la clasificación de las aguas, según su composición se hace de acuerdo a su contenido aniónico y catiónico predominante.

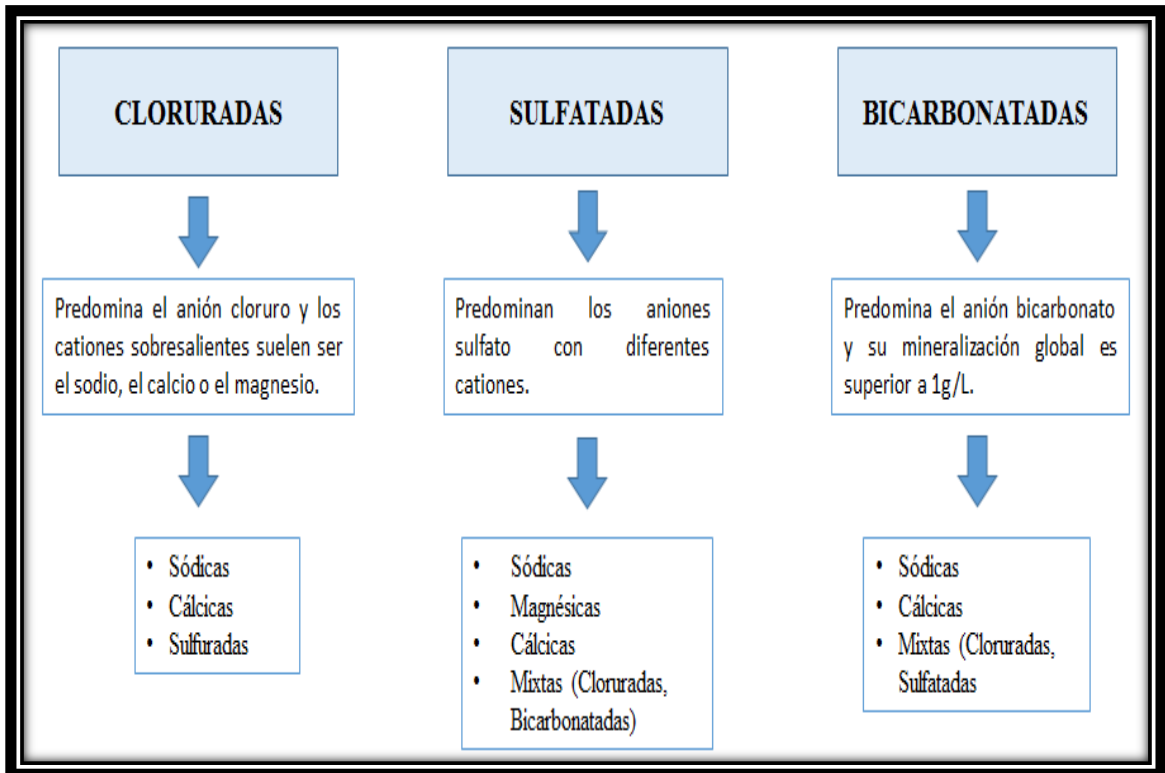


Figura 3-1. Clasificación dependiendo su composición química
Fuente: LARRAIZA, 2014

1.3 Usos Terapéuticos

Las aguas termales tienen efectos químicos y físicos sobre el cuerpo humano. Los efectos químicos se encuentran relacionados con las sustancias que posee el agua termal, que al estar en contacto con la piel. Los efectos físicos se deben a la temperatura del agua, producen efecto antiinflamatorio y calmante del dolor, con relajación muscular, provocando una sensación de bienestar.

Aguas Bicarbonatadas

Actúan sobre el metabolismo de manera que alcaliniza el pH gástrico si se toma en ayunas, disminuyendo la acidez y ayudando en el proceso digestivo. (MENDEZ, 2014)

Cuadro 5-1. Usos terapéuticos aguas bicarbonatadas

Bicarbonatadas sódicas: Afecciones gástricas (úlceras, diarreas, hipermotilidad intestinal), afecciones hepáticas y renales.

Bicarbonatadas cálcicas: Mejoran la digestión.

Bicarbonatadas mixtas: Mejoran la digestión.

Bicarbonatadas sulfatadas: Intoxicaciones hepáticas y estreñimiento.

Bicarbonatadas cloruradas: Afecciones reumáticas.

Fuente: MENDEZ, 2014

Aguas Cloruradas

Su acción se da por medio de la toma en baños que es relajante y se utilizan como terapia en reumatología, dermatología, afecciones respiratorias. (MENDEZ, 2014)

Aguas Ferruginosas

Están indicadas en casos de anemias ferropénicas, reumatismos, afecciones hepáticas, biliares y afecciones dermatológicas. (ARGUELLO, 2010)

Aguas Sulfuradas

Están indicadas principalmente para procesos reumáticos, dermatológicos como eczemas, queratosis, psoriasis o pruritos y afecciones respiratorias como laringitis, rinitis, bronquitis. (ARGUELLO, 2010)

Aguas Sulfatadas

Este tipo de aguas se caracteriza por que su temperatura y mineralización varían. Se pueden sub clasificar en: (MENDEZ, 2014)

Cuadro 6-1. Usos terapéuticos aguas sulfatadas

Sódicas y magnésicas: Acción laxante, afecciones dermatológicas, prurito.

Sulfatadas cálcicas: Indicadas en afecciones gástricas, intestinales, biliares.

Sulfatadas cloruradas: Indicadas en afecciones digestivas.

Fuente: MENDEZ, 2014

Aguas Radioactivas

Están indicadas para afecciones respiratorias, reumatológicas y dérmicas. (MENDEZ, 2014)

1.4 Aguas Minero-Medicinales Balneario “Termas La Merced”

1.4.1 Parroquia La Merced

La Merced es una parroquia rural del Distrito Metropolitano de Quito (DMQ), situada a 25 km al sur oriente de Quito, provincia de Pichincha, tiene una extensión de 3.163ha y una población de 8.394 habitantes. Se encuentra asentada a 2680 msnm, con una temperatura promedio de 18°C. (La Merced Gobierno Parroquial, 2009)

Limita al norte con la Parroquia de Cumbayá en un pequeño tramo y luego con Tumbaco, en un pliegue orográfico del monte Ilaló, al este con la Parroquia rural de Pintag, al sur una parte con la Parroquia de Pintag que la rodea en un tramo y luego con la Parroquia de Alangasí, de la cual alguna vez formó parte, y al este con la Parroquia de Alangasí que se extiende por el flanco sur oriental del monte Ilaló. (La Merced Gobierno Parroquial, 2009)

Su origen es volcánico, formado por espesos mantos de tobas volcánicas con probables formaciones calcáreas. Las aguas de las termas son utilizadas terapéuticamente para curar afecciones de la piel, contra inflamaciones de las vías urinarias. (ABALNEARIOS, 1999)

1.4.2 Balneario “Termas La Merced”

1.4.2.1 Descripción

Las aguas termo-minerales del balneario “Termas La Merced” son ricas en minerales, como sulfatos de hierro, aluminio, calcio, sodio, y potasio. Estas aguas son magníficas para problemas reumatológicos, artrosis, artritis, afecciones crónicas del aparato respiratorio como laringitis, rinitis, bronquitis; son tónicos y embellecedores de piel; el contenido sulfuroso de las aguas termales, es indicado para afecciones articulares, como procesos reumáticos y postoperatorios del aparato locomotor, neuralgias, dermatosis, infecciones alérgicas. Por la presencia de hierro, son aguas apropiadas para tratar anemias, ya que están indicadas como reconstituyentes. Sirven, por su contenido de hierro, para terapias de la obesidad, reumatismos, afecciones hepáticas, biliares para el control del estrés, y traumatismos. (TERMAS LA MERCED, 2012)

La instalación consta de dos pozos, de los cuales en un pozo actualmente se encuentra sellado y el otro pozo está habilitado, en este pozo el agua se encuentra a 37°C, mediante tuberías se lleva el agua a las dos piscinas, la primera piscina está ubicada a unos metros de la entrada del balneario, la segunda piscina está ubicada en la parte baja del balneario. El agua tiene un fuerte olor a hierro. (ABALNEARIOS, 1999)

1.4.2.2 Localización

Partiendo del playón de la Marín se toma el bus de la cooperativa” Termas Turis La Merced” (esta línea de bus llega al balneario), se dirige por la autopista general Rumiñahui durante hasta llegar al triángulo de San Rafael en donde se desvía por la vía al Tingo toma toda esta vía en 20 minutos de recorrido llega hasta el balneario Termas de la Merced. (TERMAS LA MERCED, 2012)

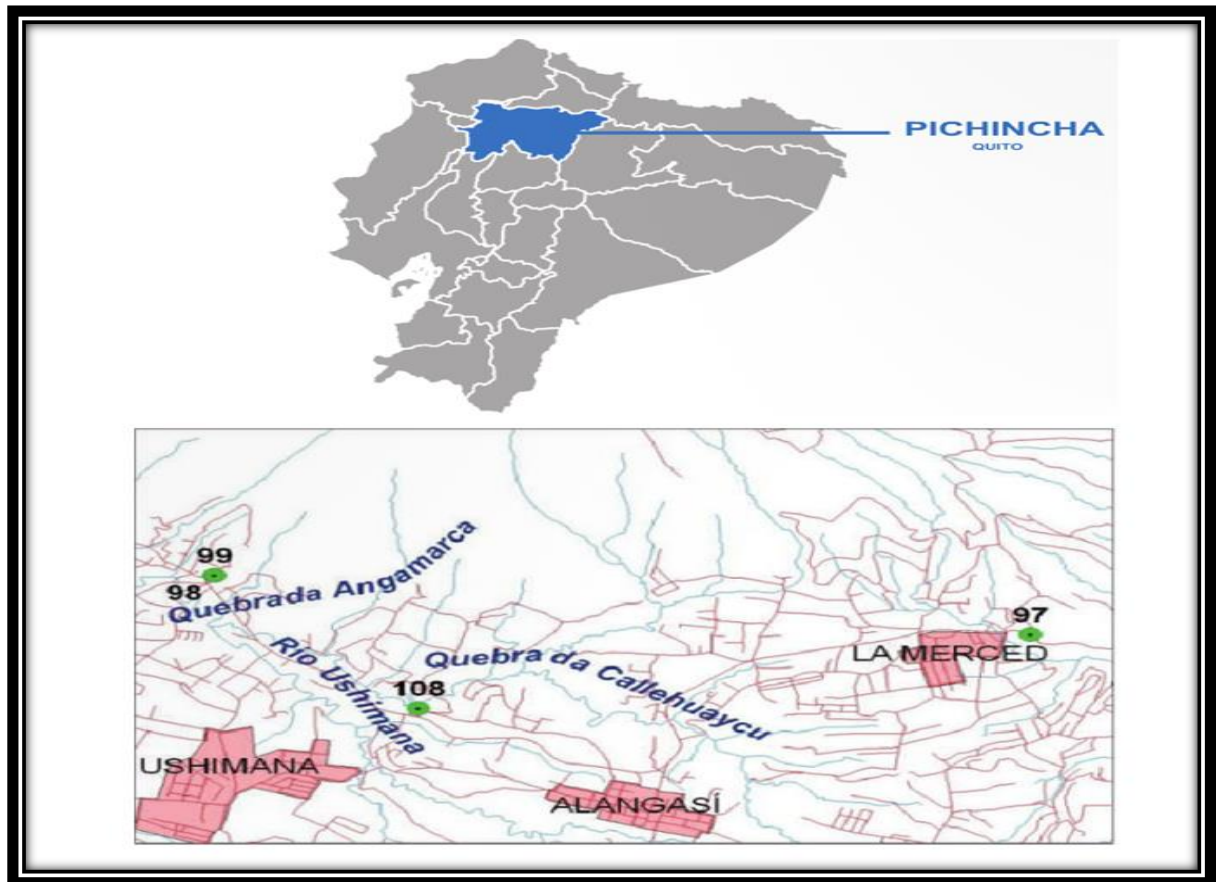


Figura 4-1. Mapa de Ubicación del Balneario “Termas La Merced”

Fuente: INAMHI, 2013

1.5 Parámetros Físico-Químicos

1.5.1 Temperatura

La temperatura influye en la solubilidad de las sustancias (aumentando los sólidos disueltos y disminuyendo la de los gases). La actividad biológica aproximadamente se duplica cada diez grados, aunque superado un cierto valor característico de cada especie viva, tiene efectos letales para los organismos. (AZNAR, 2000)

El método para la lectura de este parámetro es introducir directamente el equipo de medición (termómetro de mercurio que permite mediciones con $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ o sonda que permite precisión de $\pm 0.01^{\circ}\text{C}$) manteniéndolo a la misma profundidad en el cuerpo de agua. (ARIAS, 2003)

1.5.2 pH

Es una medida de la concentración de iones hidronio (H_3O^+) en la disolución. 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. (ARIAS, 2003)

Las muestras en campo pueden medirse directamente introduciendo la columna de agua, procurando mantener siempre la sonda a la misma profundidad. (ARIAS, 2003)

1.5.3 Color

No existe una relación directa entre color y grado de contaminación, pues al tratarse de un parámetro fuertemente influido por interferencias con otras sustancias coloreadas, es difícil su evaluación absoluta. Dado que muchas de las sustancias coloreadas se degradan con el tiempo, la determinación del color se debe realizar en las veinticuatro horas, conservándose refrigeradas (2-5 °C) y en la oscuridad. (AZNAR, 2000)

1.5.4 Olor

Generalmente los olores son producidos por sustancias volátiles o gaseosas (H_2S , NH_3 , etc.), y suelen ser debidos a materia orgánica y sustancias propias de la tierra. (AZNAR, 2000)

1.6 Microbiología de Las Aguas Minero-Medicinales

1.6.1 Microorganismo Autóctonos

Dentro de las bacterias autóctonas en las aguas termales predominan las bacterias heterótrofas oligotróficas, con escasos requerimientos de carbono y nitrógeno (oligocarbofílicas y oligonitrofilicas). En menor número se han encontrado microorganismos autótrofos, tanto quimiolitótrofos como fototrofos (cianobacterias, bacterias verdes y rojas). La mayoría son aerobios o anaerobios facultativos, de pequeño tamaño, móviles y con pigmentos. Las bacterias heterótrofas no suelen fermentar los azúcares pero son proteolíticas, amilolíticas, amonificantes y en menor número celulolíticas. Estos tipos de bacterias se consideran beneficiosas ya que

intervienen en la autodepuración de las aguas si, de una forma accidental, sufren un aporte de materia orgánica. (DE LA ROSA & MOSSO, 2000)

En manantiales de aguas sulfurosas podemos encontrar bacterias de los géneros *Beggiatoa*, *Thermothrix*, *Thiobacillus*, así como bacterias sulfatorreductoras como *Desulfotomaculum*, *Desulfovibrio*. En aguas ferruginosas es frecuente la presencia de bacterias que oxidan el ión ferroso a férrico obteniendo energía, entre ellas los géneros *Clonothrix*, *Leptothrix*, *Leucothrix*, *Sphaerotilus*. En manantiales clorurado sódicos e hipertónicos es frecuente la presencia de bacterias halófilas moderadas (*Halomonas*, *Micrococcus*, *Vibrio*) y halotolerantes (*Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Planococcus*). (DE LA ROSA & MOSSO, 2000)

En relación con las bacterias heterótrofas, las aguas hipertermales presentan una mayor proporción de bacterias Gram positivas mientras que en las mesotermas predominan los bacilos Gram negativos y los cocos Gram positivos. La elevada temperatura de las aguas hipertermales puede ser la causa de esta diferencia ya que las bacterias Gram positivas son más resistentes al calor. Los principales géneros identificados han sido: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Enterobacter*, *Acinetobacter* y *Arthrobacter* (MOSSO, 1994).

El género *Pseudomonas* es muy ubicuo y se encuentra en ambientes acuáticos con pocos nutrientes, las especies del grupo fluorescens encontradas en estas aguas *P. fluorescens* y *P. putida*, población autóctona de manantiales meso e hipotermas. En aguas con menor temperatura es frecuente la presencia de bacilos Gram negativos como *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Vibrio*, *Aeromonas*. (MOSSO, 1994).

Las numerosas especies del género *Bacillus* están ampliamente distribuidas y pueden proceder del suelo o de las propias aguas. La presencia de los cocos Gram positivos, *Staphylococcus* y *Micrococcus*, es frecuente en aguas minerales ya que resisten concentraciones altas de sal. (DE LA ROSA & MOSSO, 2000)

1.6.2 Microorganismos Alóctonos

Desde el punto de vista sanitario las aguas termales no suelen tener bacterias patógenas ni indicadores fecales pero en algunos manantiales se han detectado *coliformes*, *enterococos*, *Clostridium sulfito reductores* y *Pseudomonas aeruginosa*. La presencia de coliformes no fecales no representa un riesgo sanitario ya que pueden proceder del suelo o de los vegetales y sobreviven en ambientes acuáticos por su facilidad de adaptación formando “biofilms” (LECHEVALIER, BABCOCK, & LEE, 1987). La presencia de *P. aeruginosa* en estas aguas minero-medicinales no es deseable ya que es un patógeno oportunista y puede producir infecciones en personas

inmunodeprimidas. Su presencia puede indicar una escasa protección del manantial aunque puede colonizar ambientes acuáticos y encontrarse en aguas subterráneas no contaminadas por el hombre. (LECHEVALIER, BABCOCK, & LEE, 1987)

En cuanto a los microorganismos eucariotas se han encontrado en escasa proporción, algas y hongos, principalmente mohos de los géneros: *Penicillium*, *Aspergillus* y *Alternaria*. Estos géneros se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y no afectan a la calidad sanitaria de las aguas cuando se encuentran en número bajo. (DE LA ROSA & MOSSO, 2000)

1.7 Indicadores Microbianos de la Calidad de Aguas Termo-Minerales

Los microorganismos indicadores son aquellos que tienen un comportamiento similar a los patógenos (concentración y reacción frente a factores ambientales), sin embargo son rápidos, económicos y fáciles de identificar. (WORDPRESS, 2010)

1.7.1 Aerobios mesófilos

Se define como un grupo heterogéneo de bacterias capaces de crecer a una temperatura óptima de 35 ° C. La presencia de este tipo de microorganismos refleja la calidad sanitaria. Mediante el recuento de microorganismos aerobios mesófilos se estima la microbiota, pero sin identificar tipos de microorganismos. (JAWETZ, MELNICK, & ADELBERG, 2005)

1.7.2 Coliformes totales

Pertencen a la familia *Enterobacteriaceae*, comprende todos los bacilos Gram negativos aerobios o anaerobios facultativos, no esporulados, son de forma bacilar, fermentan la glucosa y lactosa con producción de gas en un lapso máximo de 48 h. a 35°C ± 1°C. (WORDPRESS, 2010)

1.7.3 Coliformes fecales

Están definidas como bacilos Gram negativos, no esporulados que fermentan lactosa con producción de ácido y gas a 44,5°C ± 0,2°C dentro de las 24 ± 2 horas. La bacteria más común es la *Escherichia coli*. (CAMACHO, et al, 2009)

1.7.4 Mohos y levaduras

Los hongos son generalmente aerobios estrictos, en cambio las levaduras pueden crecer con o sin oxígeno; en presencia de éste crecen mejor. Las levaduras crecen más rápido que los hongos. (FORBER, SAHNS, & WEISSFELD, 2004)

Los hongos pueden crecer a pH extremos en un rango desde 1 a 11, mientras que las levaduras crecen en un rango de pH de 2-9. (NORMA CHILENA ISO 7954, 1993)

1.7.5 *Staphylococcus aureus*

Es una especie bacteriana integrada por formas cocáceas, se agrupan en racimos, son inmóviles y carecen de esporas. Bacteria muy sensible a la acción del calor y de los desinfectantes. (PASCUAL, 2000)

1.8 Métodos de Identificación bacteriana

Actualmente, la identificación bacteriana se realiza por medio de métodos convencionales, basados en las características fenotípicas, puesto que su realización y coste los hace más asequibles. Los métodos genotípicos suelen reservarse para las bacterias que no se pueden identificar con métodos convencionales. (ÁLVAREZ, 1990)

En la mayoría de los casos la identificación no se realiza con base a un solo método, sino a la combinación de más de uno. Ejemplo: identificación de bacterias con base a criterios morfológicos, tinción diferencial, pruebas bioquímicas y serológicas. (RODRIGUÉZ, 2015)

1.8.1 Placas Petrifilm

Son medios de análisis listos para utilizar que reemplazan el agar convencional, las placas de Petrifilm se utilizan en pruebas microbianas tanto en agua como en alimentos.

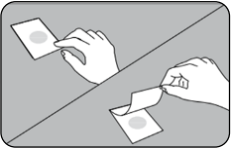
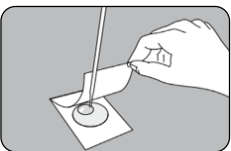
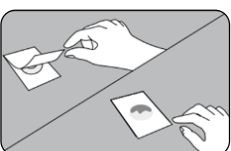
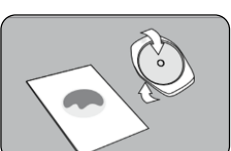
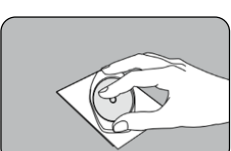
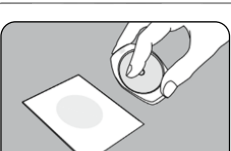
Son medios de cultivo listos para sembrar la muestra, están constituidos por ingredientes que varían de una placa a otra dependiendo del microorganismo que va a ser inoculado, pero en general un Petrifilm comprende un agente soluble en agua fría gelificante, nutrientes y los indicadores. (3M, 2014)

Las Placas 3M™ Petrifilm™ son métodos reconocidos por organismos internacionales como: (3M, 2014)

- ✓ AOAC (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS)
- ✓ AFNOR (ASOCIACION FRANCESA DE NORMALIZACION)
- ✓ NCIMS (U.S. GRADE A PASTEURIZED MILK ORDINANCE)
- ✓ CANADA – HEALTH PROTECTION BRANCH HPB (COMPENDIUM OF ANALYTICAL METHODS)
- ✓ AUSTRALIA, NEW SOUTH DAIRY TEST MANUAL.

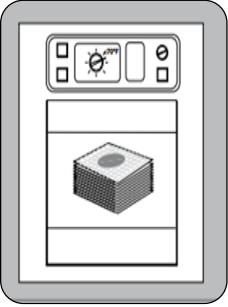
Ya que son fáciles de usar, son métodos validados, ahorran tiempo, menores costes de operación, etc. (3M, 2014)

Cuadro 7-1. Procedimiento de siembra en placas petrifilm

	<p>Se dispuso la placa 3M™ Petrifilm™ en una superficie plana. Levantando el film superior.</p>
	<p>Se colocó 1 ml de muestra en el centro aproximadamente.</p>
	<p>Se soltó el film superior dejando caer, evitando introducir burbujas.</p>
	<p>Se colocó el aplicador en el film superior bien centrado sobre el inóculo.</p>
	<p>Se aplicó presión de manera suave sobre el aplicador para distribuir el inóculo por toda la zona circular.</p>
	<p>Se levantó el aplicador. Esperamos 1 minuto hasta que solidifique el gel.</p>

Fuente: 3M, 2014

Cuadro 8-1. Incubación en placas petrifilm

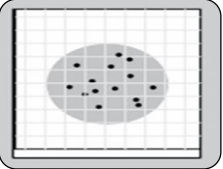


Se incubó las placas Petrifilm cara arriba y apiladas en grupos de no más de 20 placas a una temperatura:

- Aerobios mesófilos 30°C por 72 horas.
- Coliformes totales y fecales 37°C durante 48 horas.
- *S. aureus* 37°C por 24 horas.
- Mohos y levaduras 25-28°C por 48 horas.

Fuente: 3M, 2014

Cuadro 9-1. Interpretación de resultados de las placas petrifilm

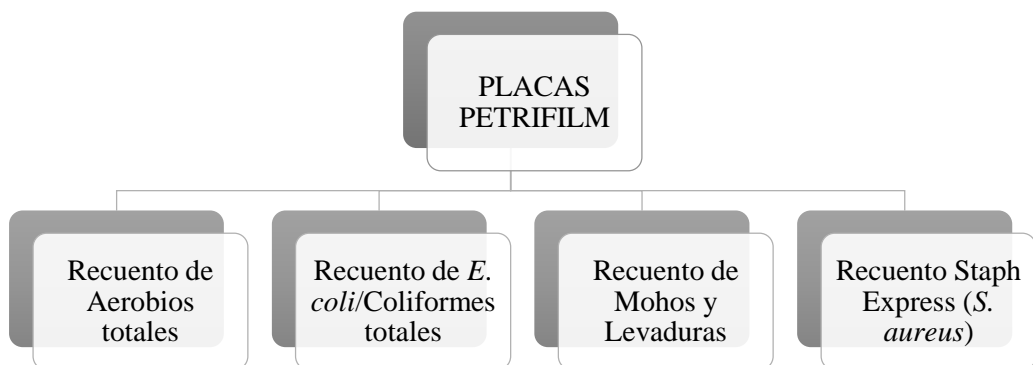


Se dio lectura de los resultados en las placas

Fuente: 3M, 2014

Los tipos de Placas 3M™ Petrifilm™, que permitirán satisfacer las necesidades de nuestro estudio se ubican en el Cuadro N°2-1, que a continuación se muestra:

Cuadro 10-1. Tipos de Petrifilm



Fuente: 3M, 2014

1.8.2 Cultivo de microorganismos

1.8.2.1 Medios de cultivo

Los microorganismos en general pueden vivir y multiplicarse sobre substratos nutritivos preparados en el laboratorio, denominados medios de cultivo. Los Medios de Cultivo son preparados estériles que contienen sustancias necesarias para el desarrollo de los microorganismos. (AQUIAHUATL, Ma. et al, 2012)

En los medios de cultivo las bacterias se multiplican y es necesario esperar al menos 18-24 horas para visualizarlas. Las bacterias tienen requerimientos nutricionales imprescindibles para su crecimiento por ejemplo necesitan una fuente de energía, una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, algunas sales, oligoelementos y agua. Todos los medios de cultivo han de cumplir como mínimo con estos requisitos pero en muchas ocasiones se necesitan además otras sustancias adicionales como vitaminas, factores o aminoácidos esenciales. (KONEMAN, E. et al, 2008)

Cuadro 11-1. Requerimientos de los microorganismos en los Medios de Cultivo

Elementos vitales	Factores de crecimiento
<ul style="list-style-type: none">• Agua	<ul style="list-style-type: none">• Aminoácidos
<ul style="list-style-type: none">• Carbono	<ul style="list-style-type: none">• Vitaminas
<ul style="list-style-type: none">• Nitrógeno	<ul style="list-style-type: none">• Purinas
<ul style="list-style-type: none">• Hidrógeno	
<ul style="list-style-type: none">• Calcio	
<ul style="list-style-type: none">• Fósforo	
<ul style="list-style-type: none">• Hierro	

Fuente: Pascual, M & Calderón, V., 1999

1.8.2.1.1 Condiciones de los medios de cultivo

1. Contener sustancias nutritivas necesarias para el desarrollo de los microorganismos (tales como aminoácidos, carbohidratos, polialcoholes, vitaminas, minerales).
2. Tener un pH que permita un desarrollo óptimo, por lo general las bacterias patógenas necesitan un pH neutro o ligeramente alcalino (7.0 – 7.4), en cambio las levaduras y hongos requieren un pH ácido (5.0).
3. Estar previamente esterilizados o preparados en condiciones asépticas.
4. Estar protegidos de la contaminación ambiental. (APELLA, MA. & ARAUJO, P., 2005)

1.8.2.1.2 Utilidad de los medios de cultivo

- a) Aislamiento de bacterias
- b) Estudio morfológico de las colonias.
- c) Conservación de cepas identificadas.
- d) Clasificación y tipificación de bacterias por estudio de sus propiedades bioquímicas en medios diferenciales.
- e) Cultivo y cosecha de bacterias para la elaboración de productos biológicos (vacunas, antígenos, etc.). (APELLA, MA. & ARAUJO, P., 2005)

1.8.2.1.3 Clasificación de los medios de cultivo

Cuadro 12-1. Clasificación según su capacidad de crecimiento

Medios básicos:	Son medios ricos en nutrientes que permiten el crecimiento de la gran mayoría de las bacterias. Se utilizan en la siembra primaria de las muestras.
Medios de enriquecimiento	Se usan para recuperar bacterias exigentes en sus requerimientos nutricionales. Se utilizan para bacterias que no crecen en medios básicos. Los más utilizados suelen ser medios líquidos.
Medios selectivos	Contienen sustancias como cloruro sódico a dosis elevadas, citrato sódico, cristal violeta, sales biliares o antibióticos y antisépticos que fomentan el crecimiento de algunas bacterias y evitan el de otras. Son de gran utilidad para el aislamiento bacteriano a partir de una población bacteriana mixta.

Medios diferenciales	Son medios que distinguen entre distintos grupos bacterianos en función casi siempre del color de sus colonias. Por ejemplo, el agar MacConkey permite el crecimiento de bacilos gramnegativos fermentadores y no fermentadores de lactosa. Los medios diferenciales, además, pueden poner de manifiesto mezclas y contaminaciones en los cultivos
Medios cromogénicos	En éstos se incorporan sustancias cromogénicas para detectar distintas enzimas producidas por los microorganismos. Cuando la bacteria produce el enzima, hidroliza el sustrato y se libera un compuesto cromogénico que adquiere un color intenso, dando color a la colonia.

Fuente: AQUIAHUATL, Ma. De los Ángeles. et al., 2012

1.8.2.1.4 *Composición de los medios de cultivo*

Según la finalidad, los medios de cultivo pueden tener en su composición los siguientes ingredientes:

- 1) Aminoácidos, hidrolizado de proteínas (peptonas)
- 2) Extractos
- 3) Productos biliados
- 4) Carbohidratos
- 5) Productos bioquímicos
- 6) Colorantes e indicadores. (AQUIAHUATL, Ma. De los Ángeles. et al. 2012)

1.8.3 *Características Macroscópicas*

La morfología de las colonias es fundamental en la identificación preliminar y para la diferenciación de los microorganismos. Para la observación morfológica es preferible examinar colonias de cultivos frescos crecidas en medios no selectivos. En este paso de la identificación es muy importante el aislamiento de las bacterias en cultivo puro ya que esta debería estar compuesta por un solo tipo de microorganismos y procedería de una única célula. Las colonias de una única especie, cuando crecen en medios específicos y bajo condiciones idóneas se describen por sus características de tamaño, forma, consistencia, y a veces por su color. (NUÑEZ, 1996)

1.8.4 Tinción Gram

Esta tinción se denominada así por el bacteriólogo danés Christian Gram, quien la desarrolló en 1844. Sobre la base de su reacción a la tinción de Gram, las bacterias pueden dividirse en dos grupos, Gram positivas y Gram negativas (en este caso, los términos positivo y negativo no tiene nada que ver con carga eléctrica, sino simplemente designan dos grupos morfológicos distintos de bacterias). (ÁLVAREZ, 1990)

Las bacterias Gram positivas y Gram negativas se tiñen de forma distinta debido a las diferencias en la estructura de sus paredes celulares. La pared de la célula bacteriana ayuda tanto en el tamaño y forma, así como para prevenir la lisis osmótica. El material de la pared celular bacteriana que confiere la rigidez es el peptidoglicano. La pared de la célula Gram positiva es gruesa y consiste en varias capas interconectadas de peptidoglicano así como algo de ácido teicoico. Generalmente, 80%-90% de la pared de la célula Gram positiva es peptidoglicano. La pared de la célula Gram negativa, por otro lado, contiene una capa mucho más delgada, únicamente de peptidoglicano y está rodeada por una membrana exterior compuesta de fosfolípidos, lipopolisacáridos, y lipoproteínas. (Figura N°5-1). (KONEMAN, E, et al, 2008)

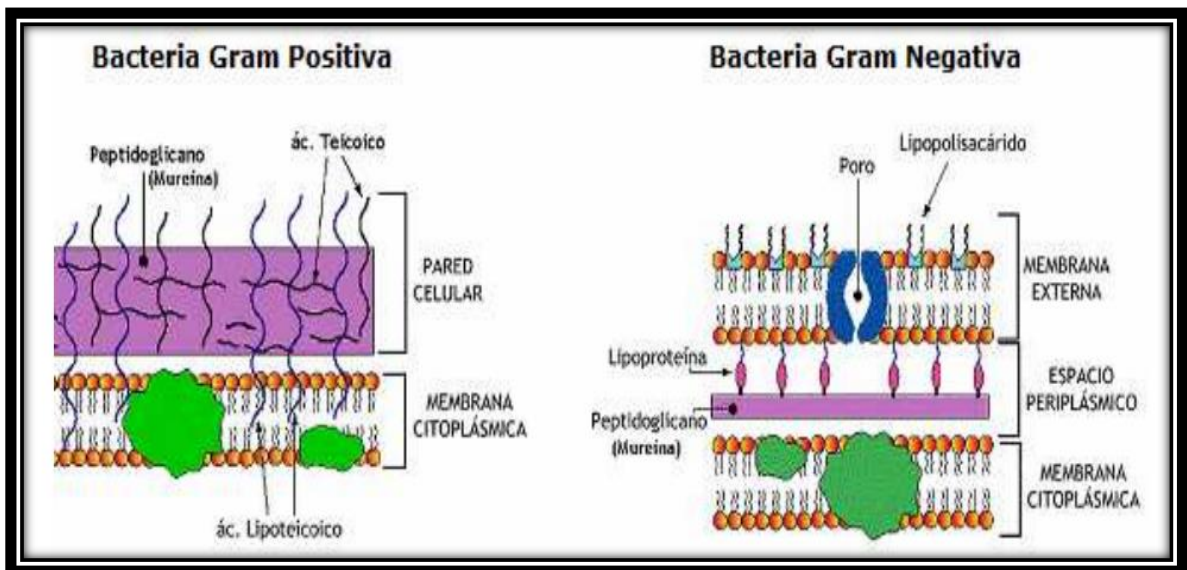


Figura 5-1. Diferencias de la pared celular de las bacterias Gram positivas y Gram negativas

Fuente: Universidad Tecnológica Nacional (2009)

http://www.fro.utn.edu.ar/repositorio/catedras/quimica/5_anio/biotecnologia/practico4.pdf

1.8.5 Características Microscópicas

Después de haber realizado la tinción se observa la forma, la manera de agruparse, la estructura de las células y su tamaño. Las tinciones son el primer paso para la identificación bacteriana. (RODRIGUÉZ, 2015)

La tinción más utilizada es la tinción de Gram a menudo la primera y única herramienta de la que nos servimos para hacer un diagnóstico provisional en el proceso de identificación de la mayoría de las bacterias teniendo en cuenta el tipo de muestra de donde proviene. (RODRIGUÉZ, 2015)

Cuadro 13-1. Términos usados

Tinción	Uniforme, irregular, unipolar, bipolar, etc.
Forma	Cocos, bacilos, cocobacilos, filamentosos, etc.
Cápsula	Presente o ausente.
Tamaño	Cortos, largos.
Disposición	Parejas, cadenas, tétradas, racimos, etc.
Formas irregulares	Variación en forma y tamaño, ramificados, fusiformes, etc.

Fuente: NUÑEZ, 1996

1.9 Pruebas Bioquímicas

Las pruebas bioquímicas permiten determinar y diferenciar características metabólicas de las bacterias. Se fundamentan en demostrar si un microorganismo tiene la capacidad de fermentar azúcares, presencia de enzimas, degradación de compuestos, producción de compuestos coloreados, etc. (FERNÁNDEZ, A. et al. 2006)

1.9.1 Catalasa

La catalasa es una enzima que descompone el agua oxigenada en agua y oxígeno molecular que se libera en forma de burbujas, presente en la mayoría de los microorganismos que poseen citocromos. Las bacterias lo usan como sistema de defensa. La detección es realizada al añadir una gota de agua oxigenada sobre la muestra (colonia) o colocando una cantidad de colonia en un porta objetos y posteriormente añadiendo el reactivo. Si la reacción es positiva se observara un burbujeo de oxígeno. (IZURIETA, N. 2011).

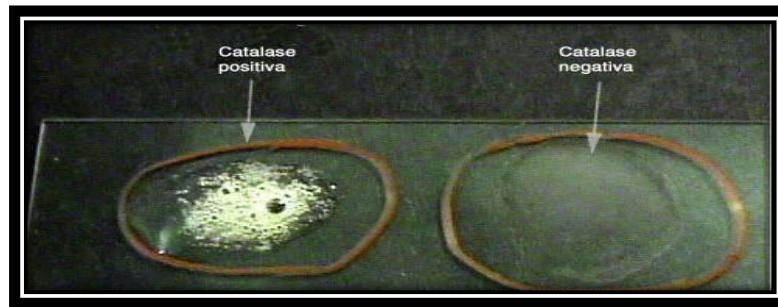


Figura 6-1. Prueba Bioquímica Catalasa

Fuente: IZURIETA, N. 2011

1.9.2 Oxidasa

Esta prueba sirve para determinar la presencia de enzimas oxidasas. La reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromo oxidasa que activa la oxidación del citocromo el cual es reducido por el oxígeno molecular, el que a su vez actúa como un aceptor de electrones en la fase terminal del sistema de transferencia de electrones. Para detectar se utiliza un disco de papel que está incorporado de un sustrato (oxalato de para-amino-dimetil-anilina), se impregna la colonia en el disco se espera unos minutos y si el sustrato es degradado la prueba es positiva y se da un color violeta en el disco. (KONEMAN, E. et al. 2008)



Figura 7-1. Prueba Bioquímica Oxidasa

Fuente: IZURIETA, N. 2011

1.9.3 Oxidación/Fermentación

Mediante esta prueba se va a determinar si la utilización de los hidratos de carbono por parte de un microorganismo se realiza por vía oxidativa (proceso aeróbico, presencia de oxígeno) o por vía fermentativa (proceso anaeróbico, ausencia de oxígeno). (FERNÁNDEZ, A. et al. 2006)

La principal diferencia es la necesidad de oxígeno atmosférico (oxidativa) y una fosforilación inicial (fermentativa). Por prueba se inoculan dos tubos de medio semisólido y uno de ellos se

sella con aceite mineral o parafina para impedir la entrada de oxígeno. La producción de ácido se observa por el cambio del indicador a amarillo. En los tubos positivos puede haber generación de gas. Si el microorganismo es únicamente oxidante después de incubar sólo estará amarillo el medio sin cubrir con parafina, si es oxidante y fermentador en ambos tubos el color virará a amarillo y si sólo puede utilizar el azúcar cuando no hay oxígeno sería fermentador (tubo con parafina amarillo). Si la bacteria no oxida ni fermenta el azúcar añadido los tubos no viran de color. (FERNÁNDEZ, A. et al. 2006)

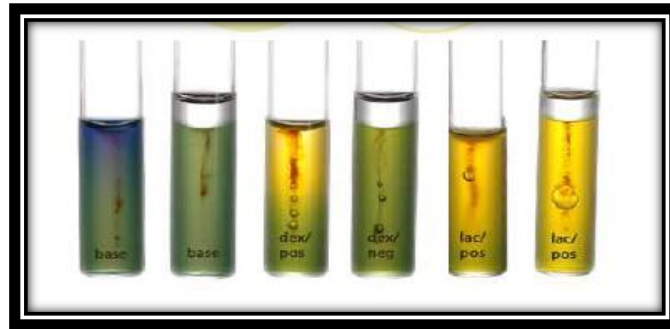


Figura 8-1. Prueba Bioquímica O/F
Fuente: IZURIETA, N. 2011

1.9.4 Agar Hierro de Kligler

Según Fernández A y colaboradores, mediante esta prueba se puede determinar:

- La capacidad de un microorganismo de metabolizar un hidrato de carbono específico (en este caso glucosa, lactosa o ambas) incorporado en un medio de crecimiento básico.
- Producción o no de gases: CO_2 e H_2 como productos finales del metabolismo de los hidratos de carbono.
- Producción de ácido sulfhídrico (SH_2).

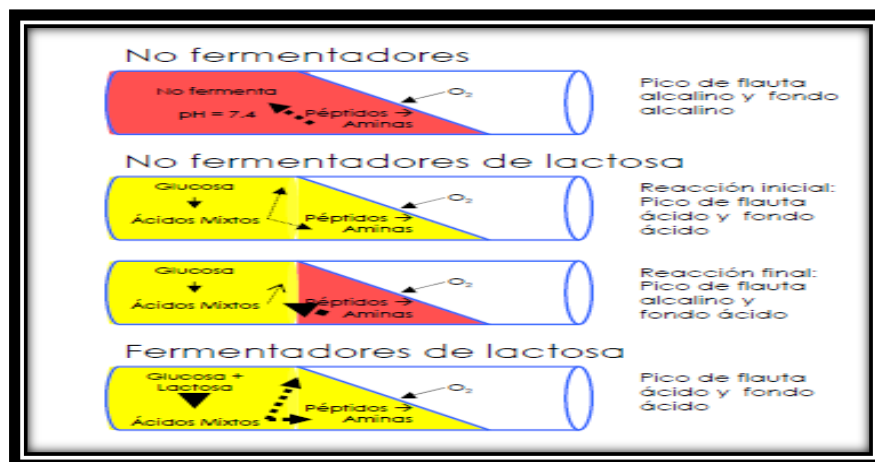


Figura 9-1. Prueba Bioquímica Kligler
Fuente: IZURIETA, N. 2011

1.9.5 Utilización de Citrato

Esta prueba sirve para determinar si un microorganismo es capaz de utilizar citrato como única fuente de carbono y compuestos amoniacales como única fuente de nitrógeno en su metabolismo, provocando una alcalinización del medio. Se cultiva el microorganismo en agar citrato de Simmons, se coloca el agar en forma inclinada. La reacción es positiva si da un viraje de verde a azul. (IZURIETA, N. 2011)



Figura 10-1. Prueba Bioquímica Citrato
Fuente: IZURIETA, N. 2011

1.9.6 Medio SIM (Sulfhídrico Indol Movilidad)

En presencia de tiosulfato en el medio o la degradación de proteínas liberando aminoácidos azufrados, algunos microorganismos forman H_2S gaseoso por medio de las enzimas tiosulfato reductasa y cisteína desulfurilasa. El gas incoloro H_2S reacciona con el citrato de amonio férrico para producir un precipitado negro insoluble de sulfuro ferroso metálico. (FERNÁNDEZ, A. et al. 2006)



Figura 11-1. Prueba Bioquímica SIM (Producción de H_2S)
Fuente: IZURIETA, N. 2011

Las enzimas triptofanasas oxidan el triptófano para formar tres metabolitos: indol, metil indol y ácido indolacético. El reactivo de Kovacs (a base de para-dimetil-amino-benzaldehído) se le añade al medio líquido y da un anillo de color rojo si la reacción es positiva. (FERNÁNDEZ, A. et al. 2006)

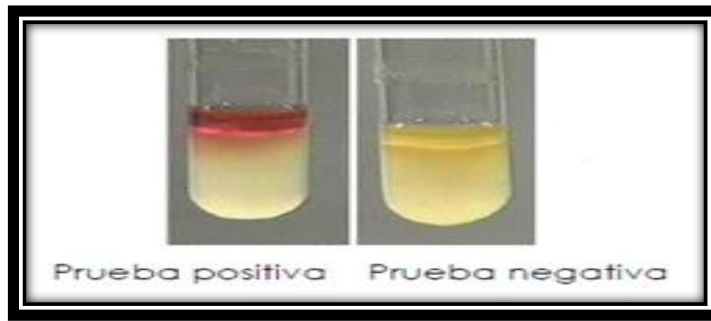


Figura 12-1. Prueba Bioquímica SIM (Indol)
 Fuente: IZURIETA, N. 2011

El medio de cultivo tiene consistencia semisólida por lo que la movilidad se observa por el crecimiento del microorganismo en todo el tubo, más allá de la zona de inoculación (picadura). Los microorganismos inmóviles solo crecerán en la zona inoculada. (FERNÁNDEZ, A. et al. 2006)



Figura 13-1. Prueba Bioquímica SIM (Movilidad)
 Fuente: IZURIETA, N. 2011

1.9.7 Ureasa

La hidrólisis de la urea por la enzima ureasa libera dos moléculas de amoníaco que alcaliniza el medio, entonces se vira el indicador de pH. Las bacterias se inoculan en agar urea, la formación de amoníaco alcaliniza el medio y el indicador vira de amarillo a rosa intenso. (APELLA, MA. & ARAUJO, P. 2005)



Figura 14-1. Prueba Bioquímica Ureasa
 Fuente: IZURIETA, N. 2011

1.9.8 Hidrolisis del Almidón

El almidón es un carbohidrato complejo que es degradado por microorganismos que contienen amilasas. Las moléculas de yodo están atrapadas dentro de la hélice no ramificada de unidades de glucosa de la cadena de amilosa para formar un compuesto de inclusión azul. Si la red se desintegra como ocurre durante la hidrólisis del almidón y las dextrinas por definición se produce una mezcla de dos moléculas de polisacáridos poliglucosa: amilosa lineal que solo da glucosa con la hidrólisis se denomina glucosán. La hidrólisis de almidón es analizada en medios conteniendo almidón en placa. Después de incubar se inundan las placas con lugol que al unirse con el almidón intacto forma un complejo púrpura. (MACFADDIN, J. 2003)

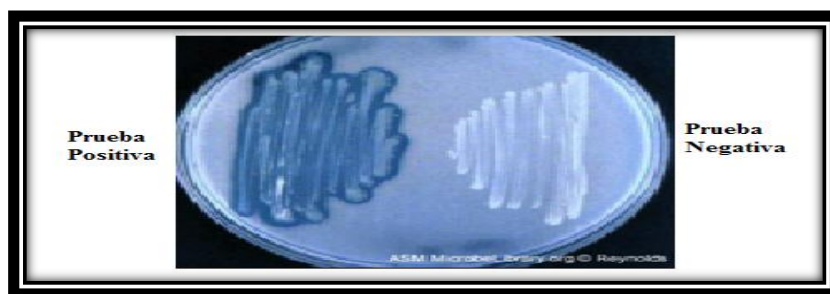


Figura 15-1. Prueba Hidrólisis del Almidón
Fuente: IZURIETA, N. 2011

1.9.9 Hidrólisis de la Gelatina

La prueba de hidrólisis de gelatina se utiliza como medio de cultivo agar gelatina, en esta prueba se pretende determinar la capacidad de un microorganismo de producir enzimas proteolíticas (gelatinasas) que licuan/hidrolizan la gelatina o muestran cambios característicos debido a los productos de degradación. La gelatina como proteína derivada del colágeno animal es hidrolizada por la gelatinasa en sus aminoácidos constituidos, con pérdida de sus características gelificantes. Se pueden emplear varios medios que permiten la visualización macroscópica como la gelatina adherida a carbón activado. (MACFADDIN, J. 2003)

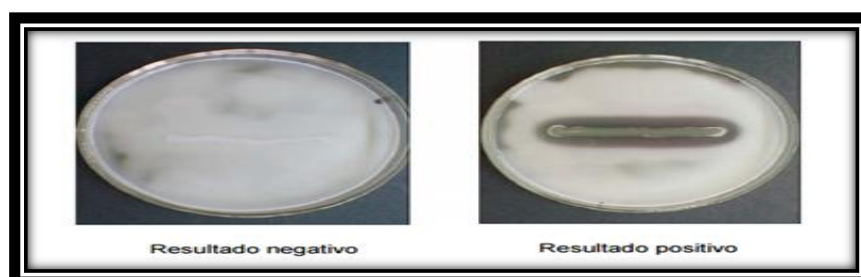


Figura 16-1. Prueba Hidrólisis de la Gelatina
Fuente: IZURIETA, N. 2011

1.10 Galerías Multipuebas (Microgen™)

Se trata de celdillas aisladas con un sustrato liofilizado que se inoculan individualmente y que permiten realizar simultáneamente 12 pruebas bioquímicas GN A y 12 pruebas más en el GN B. Los resultados de las pruebas se expresan de forma numérica (los resultados de las pruebas 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. Para codificar el dígito de un trío de pruebas se establece el siguiente sistema:

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

El código numérico se obtiene sumando los valores de las tres pruebas. Los límites inferior y superior del código son 0 y 7 respectivamente. Ante un microorganismo problema, se busca el código numérico y se comprueba a qué bacteria pertenece. (PISABARRO, A. 2008)



Figura 17-1. Galerías Microgen™

Fuente: PISABARRO, A. 2008

SISTEMAS COMERCIALES DE IDENTIFICACIÓN

Se basan en:

- Reacciones basadas en pH
- Reacciones enzimáticas
- Utilización de carbono

- Detección de crecimiento bacteriano
- Detección de ácidos grasos volátiles y no-volátiles por cromatografía. (APELLA, MA. & ARAUJO, P. 2005)

1.11 Pruebas de Resistencia antibiótica

Se ve la resistencia y sensibilidad de la bacteria frente a diversos antimicrobianos. Pueden usarse discos de papel impregnados con los antibióticos, colocados sobre una placa previamente inoculada con la cepa problema. Si se produce halo de inhibición del crecimiento la bacteria es sensible al antibiótico. (APELLA, MA. & ARAUJO, P. 2005)

1.11.1 Antibiograma

“El antibiograma es la prueba microbiológica que se realiza para determinar la sensibilidad de una colonia bacteriana a un antibiótico o grupo de antibióticos. El antibiograma permite definir para cada antibiótico, si la bacteria es sensible (antibiótico eficaz) o resistente (antibiótico ineficaz). El antibiograma permite medir la capacidad de un antibiótico a inhibir el crecimiento bacteriano. Permite evaluar la eficacia de un antibiótico sobre una bacteria”. (SALUD.KIOSKEA.NET. 2015)

La determinación de la Concentración Mínima Inhibidora (CMI) es la base de la medida de la sensibilidad de una bacteria a un determinado antibiótico. La CIM se define como la menor concentración de un antibiótico que provoca una inhibición de cualquier crecimiento bacteriano visible. Mediante el antibiograma se permiten categorizar una cierta cepa bacteriana en función de su sensibilidad frente al antibiótico probado. Esta cepa se denomina Sensible (S) o Resistente (R) al antibiótico.

- Sensible, si existe una buena probabilidad de éxito terapéutico en el caso de un tratamiento a la dosis habitual.
- Resistente, si la probabilidad de éxito terapéutico es nula o muy reducida. No es de esperar ningún efecto terapéutico sea cual fuere el tipo de tratamiento. (SALUD.KIOSKEA.NET. 2015)

1.11.1.1 Difusión en agar

Este método incorpora el antimicrobiano a discos de papel de filtro. Su introducción permitió agilizar la determinación de la sensibilidad de las cepas bacterianas frente a un número importante de antimicrobianos de forma simultánea. El empleo de los discos de papel de filtro para las pruebas de sensibilidad está estandarizado y se correlaciona con las CMI. Durante muchos años,

y a pesar de ser una técnica puramente cualitativa, el método de difusión por disco (o método Kirby-Bauer), en función sobre todo de su comodidad, economía y fiabilidad, ha sido uno de los más utilizados en los laboratorios. (CERCENADOA, E & SAAVEDRA, J. 2009)

El microorganismo a investigar se inocula en una o varias placas de agar y sobre su superficie se disponen los discos correspondientes a varios antibióticos. Se incuban las placas durante 16-24 horas y se estudia el crecimiento en ellas (Figura N° 18-1). Se valora el diámetro de la zona de inhibición que se forma alrededor de cada disco y se compara con las referencias. De esta manera se sabe si el microorganismo es Sensible o Resistente a cada uno de los antibióticos. (CERCENADOA, E & SAAVEDRA, J. 2009)



Figura 18-1. Realización del Antibiograma

Fuente: <https://sites.google.com/a/goumh.umh.es/practicas-de-microbiologia/indice/estudio-de-la-sensibilidad-a-antimicrobianos/antibiograma>

1.12 Enzimas metalo- β -lactamasas (MBLs)

Estas enzimas denominadas metalo β -lactamasas (MBLs) se caracterizan por la habilidad de hidrolizar los carbapenemes y los inhibidores de β -lactámicos como ácido clavulánico y tazobactam, pero susceptibles a la inhibición por agentes quelantes como EDTA, ácido mercaptoacético y ácido mercaptopropiónico (MPA). El mecanismo de hidrólisis depende de la interacción de los β -lactámicos con iones de zinc presentes en el sitio activo de la enzima, por lo cual estas enzimas únicamente son inhibidas por quelantes de iones metálicos. (QUEENAN, A & BUSH, K, 2007).

1.13 Géneros de las Bacterias encontradas en el Estudio Microbiológico

Cuadro 14-1. Géneros de las bacterias con sus características

GENERO	CARACTERÍSTICAS
GRAM NEGATIVOS	
<i>Acinetobacter</i>	Bacilos Gram negativo, no forman esporas, aerobios, catalasa positivo, oxidasa negativo, móviles, oxidativos, dispuestos en pares o cadenas de longitud variable, temperatura óptima de crecimiento es de 33-35 °C.
<i>Aeromonas</i>	Bacilos Gram negativos con extremos redondeados, dispuestos en pares o cadenas cortas, no forman esporas, anaerobios facultativos, catalasa positivo, oxidasa positivo, movilidad variable, son fermentadores y oxidativos, temperatura óptima de crecimiento es 22-28 °C.
<i>Brevundimonas</i>	Bacilos Gram negativos, rectos, delgados, no forman esporas, aerobios, catalasa variable, oxidasa positivo, móviles, oxidativos, temperatura óptima de crecimiento 30-37 °C.
<i>Budvicia</i>	Bacteria Gram-negativa con células que son en forma de barra, no son móviles, no forman esporas, y no son encapsulados, anaerobio facultativo, fermenta la glucosa y reduce los nitratos. Las células pueden hidrolizar la urea y producir la enzima catalasa.
<i>Citrobacter</i>	Bacilos Gram negativos aerobio, patógeno oportunista, produce factores de virulencia como endotoxinas. Son bacterias móviles, con capacidad variable para fermentar la lactosa, algunos pueden utilizar citrato y otros no.
<i>Pseudomonas</i>	Bacilo Gram negativo, rectos o ligeramente curvos, no forman esporas, aerobios, catalasa positivo, oxidasa variable, movilidad variable, oxidativos, temperatura óptima de crecimiento 30-37 °C.
<i>Xenorhabdus</i>	Bacterias Gram-negativas móviles, tiene la particularidad de que todas las especies del género viven en simbiosis con nematodos.
GRAM POSITIVO	
<i>Bacillus</i>	Bacilo Gram positivo, dispuesto en pares o en cadenas, catalasa variable (por lo común positivos), movilidad por lo común positiva, oxidasa variable, fermentativos u oxidativos o ambos, reducción de nitratos variable, temperatura óptima de crecimiento 35 °C.
Fuente: MACFADDIN, 2003	

CAPITULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1 Parte Experimental

En este capítulo se presenta la parte experimental del estudio desarrollado con el objeto de investigar a nivel microbiológico las aguas termo-minerales del Balneario “Termas La Merced, para determinar la calidad sanitaria, este proyecto no ha sido abordado con anterioridad y es por esto que las referencias son muy escasas lo cual nos lleva a decir que es un estudio pionero para posteriores investigaciones.

2.2 Diseño del Estudio Microbiológico

2.2.1 *Características del Lugar de Investigación*

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo:

- LUGAR: Laboratorio de Análisis bioquímicos y bacteriológicos de la Facultad de Ciencias-ESPOCH.
- CANTÓN: Riobamba.
- PROVINCIA: Chimborazo.

2.2.2 *Factores de Estudio*

Población: Aguas termales Minero-medicinales del Ecuador.

Muestras: Aguas termales Minero-medicinales del Balneario “Termas La Merced” ubicado en la parroquia La Merced, perteneciente a la Provincia de Pichincha.

2.2.3 *Manejo Específico del Estudio*

2.2.3.1 *Lugar del muestreo*

El muestreo se lo realizó en el Balneario “Termas La Merced”, se tomaron las muestras de agua en el pozo y en la piscina, la muestra fue tratada por duplicado.



Fotografía 1: Puntos de muestreo (Pozo)
Fuente: NARANJO, C.2015



Fotografía 2: Puntos de muestreo (piscina)
Fuente: NARANJO, C.2015

El volumen aproximado de cada muestra fue de 100 mL del agua del Balneario “Termas La Merced”, se recolectaron las muestras a la 06:40 Am, con una temperatura ambiente de 10°C, en la parroquia La Merced, Provincia de Pichincha.

2.2.3.2 Lugar y Pruebas de Ensayo

El siguiente perfil de investigación se efectuó en el Laboratorio de Análisis bioquímicos y bacteriológicos de la Facultad de Ciencias - ESPOCH, ubicado en la provincia de Chimborazo, cantón Riobamba.

Los análisis realizados fueron:

- Siembra de la muestra por el método de Petrifilm (Recuento de Aerobios totales, Recuento de *Escherichia coli* y coliformes totales, Recuento de Mohos y Levaduras y Recuento de *Staphylococcus aureus* “Staph express”).
- De los resultados obtenidos se realizaron repiques hasta obtener un clon puro al que después se le realizó tinción Gram, pruebas bioquímicas (oxidasa, catalasa, oxidación/ fermentación, kligler, citrato y ureasa), resistencia antibiótica y la identificación del clon puro por medio de las galerías de Microgen™.

2.2 Materiales, equipos y reactivos

En el Estudio Microbiológico del manantial termal del Balneario “Termas La Merced” se utilizaron materiales, equipos y reactivos que se muestran en el Cuadro N°1-2.

Cuadro N°1-2 Materiales, equipos y reactivos de laboratorio

<i>Materiales</i>	<i>Equipos</i>	<i>Reactivos</i>
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Equipo de bioseguridad (mandil, cofia, guantes, mascarilla, etc.). ✓ Equipo de limpieza (toallas, algodón, alcohol, etc.). ✓ Cámara fotográfica ✓ Cuaderno de apuntes ✓ Envases estériles 120 mL ✓ Puntas amarillas y azules ✓ Pipetas de 100 y 1000 µL ✓ Placas petrifilm ✓ Palillos ✓ Asa ✓ Cajas petri ✓ Galerías Microgen ✓ Placas portaobjetos ✓ Parafilm ✓ Material de vidrio (Matraz Erlenmeyer, probetas, tubos, etc). ✓ Agua destilada ✓ Mechero ✓ Discos de antibióticos 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Multiparámetros HANNA ✓ Cámara de flujo laminar ✓ Estufa ✓ Microscopio ✓ Autoclave 	<p>Tinción Gram:</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Cristal violeta ✓ Lugol ✓ Alcohol-acetona ✓ Safranina <p>Medios de cultivo</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Agar OF ✓ Agar Mueller Hinton ✓ Agar King A ✓ Agar SIM ✓ Agar citrato ✓ Agar urea ✓ Agar kligler ✓ Agar manitol ✓ Agar EMB

Realizado por: NARANJO, C. 2015

2.3 Métodos y Técnicas

2.3.1 Muestreo

Se tomó muestras del manantial termal Balneario “Termas La Merced”, en dos lugares, la primera muestra tomada fue en un pozo, el cual está ubicado al lado izquierdo del balneario y la segunda muestra se tomó en una de las piscinas, esta se ubica en la parte baja del balneario. El muestreo se lo realizó el 4 de Febrero del 2015, la temperatura ambiente estaba en 10°C al momento de realizar la toma de muestra. (NTE INEN 2169:98, 2013)

2.3.1.1 Toma de muestra

La muestra fue tomada en un recipiente (boca ancha, tapa protectora con cierre hermético y de material de plástico) formado un ángulo de 45° con la horizontal, boca arriba, contra corriente hasta que casi toque el agua, luego se procedió a sacar la tapa al mismo tiempo que el recipiente se introduce contra corriente mientras se llenaba las tres cuartas partes, teniendo cuidado con las manos, éstas no deben tocar el agua del interior del recipiente. (GUEVARA, 1996)

2.3.2 Registro

Las condiciones detalladas en las cuales fueron recogidas las muestras se anotaron en una libreta de campo, se etiquetaron los recipientes para su identificación, estos deben ser llenados al momento de la recolección. (NTE INEN 2176:2013)

Cuadro 2-2. Datos en el informe de muestreo

Localización del sitio del muestreo, con coordenadas.	Detalles del punto de muestreo.	Fecha de la recolección.	Método de recolección.
Hora de la recolección.	Nombre del recolector.	Condiciones atmosféricas.	Datos recogidos en el campo.

Fuente: NTE INEN 2176:2013

2.3.3 Determinación del parámetros in-situ

Se utilizó el Multiparámetros HANNA, como primer paso lo encendimos al equipo, luego se escogió en el menú la opción de calibración, posteriormente se sumergió la sonda en la muestra de agua termales, el medidor visualizará las lecturas relativas de los parámetros habilitados (pH, conductividad, sólidos disueltos totales), al finalizar el análisis se debe lavar con agua destilada. (CERON, VALLEJO, & GARCIA, 1998)

La temperatura del manantial de igual manera se tomó con el multiparámetros y la temperatura del ambiente, se tomó con la ayuda de un termómetro de mercurio. (CERON, VALLEJO, & GARCIA, 1998)

2.3.4 Conservación y transporte de las muestras

Se debió asegurar que cada muestra este correctamente identificada tanto en el recipiente como en la libreta de anotaciones. Para la conservación y transporte utilizamos un cooler, esto nos ayudó para que a la muestra no se afecte con la luz, aire, tc., las muestras fueron trasladadas al laboratorio de la Facultad de Ciencias, para realizar el analisis antes de las 48 horas según la norma NTE INEN 2169:2013.

2.3.5 Análisis de laboratorio

El análisis microbiológico se debió desinfectar la cámara de flujo laminar esto se realizó colocando por 30 minutos aproximadamente con el UV.

2.3.5.1 Método de Petrifilm

Las placas 3M™ Petrifilm™, que se usaron para los diferentes recuentos fueron para bacterias aerobias mesófilas, coliformes totales y fecales, *Staphylococcus aureus*, mohos y levaduras.

Procedimiento:

- Se dispuso de la placa 3M™ Petrifilm™ en una superficie plana. Levantar el film superior.
- Con la pipeta se cogió 1 ml de muestra al centro aproximadamente del film inferior.
- Se soltó el film superior y dejarlo caer, evitando introducir burbujas. No deslizar el film hacia abajo.
- Se colocó el aplicador en el film superior bien centrado sobre el inóculo.

- Se aplicó presión de manera suave sobre el aplicador para distribuir el inóculo por toda la zona circular.
- Luego se incubó las placas Petrifilm a una temperatura:
 - Aerobios mesófilos 30°C por 72 horas.
 - Coliformes totales y fecales 37°C durante 48 horas.
 - *S. aureus* 37°C por 24 horas.
 - Mohos y levaduras 25-28°C por 48 horas.
- ❖ Finalmente se realizó el conteo de las colonias. (3M, 2009)

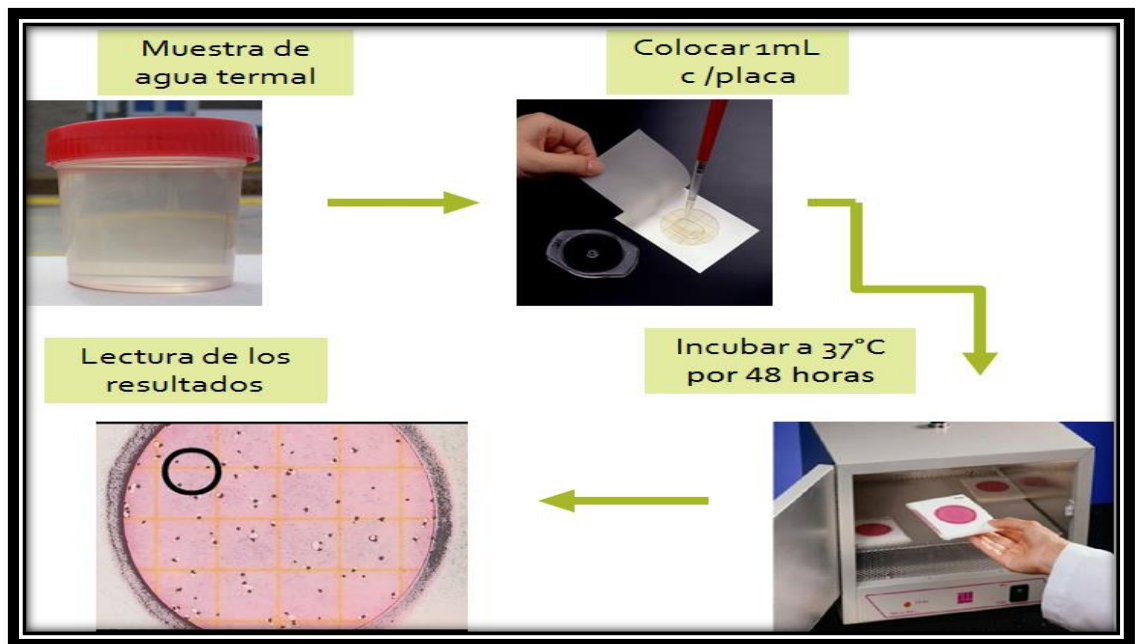


Figura 1-2. Siembra en Placas Petrifilm™
Realizado por: NARANJO, C. 2015

2.3.5.2 Descripción macroscópica de las colonias

Se lo realiza a simple vista o con la ayuda de una lupa. Se anota todas las características relevantes y particulares de cada clon como son:

- Color
- Forma
- Elevación
- Bordes
- Diámetro de la colonia
- Textura
- Presencia de mucosidad
- Manchas o puntos

- Olor
- Iridiscencia
- Presencia de pigmentos

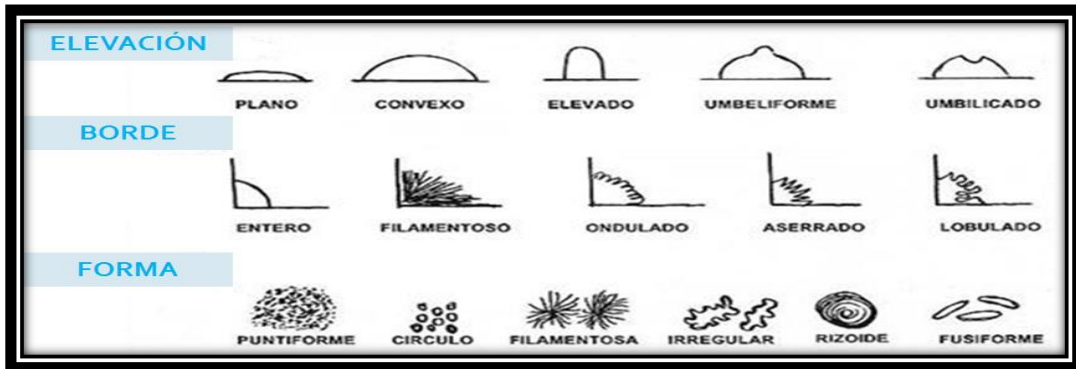


Figura 2-2. Descripción macroscópica
 Fuente: PRESCOTT, L.M., (2004)

2.3.5.3 Estabilización del aislado bacteriano

Se seleccionó las colonias bacterianas a ser utilizadas en el estudio, se escogió de cada una de las placas de Petrifilm™ sembradas (bacterias aerobias mesófilas, mohos y levaduras, *S. aureus*, coliformes totales y fecales). Posteriormente se preparó el medio de cultivo Mueller Hinton para poder realizar el aislamiento, en esta placa se colocó una cuadrícula al fondo y en cada cuadro se inoculó una colonia distinta de las seleccionadas anteriormente. Se realizó la estabilidad del aislado con 4 o más repiques dependiendo del caso, hasta que se consiguió un crecimiento continuo de las colonias inoculadas. En el último repique se realizó una siembra por agotamiento para obtener clones aislados.

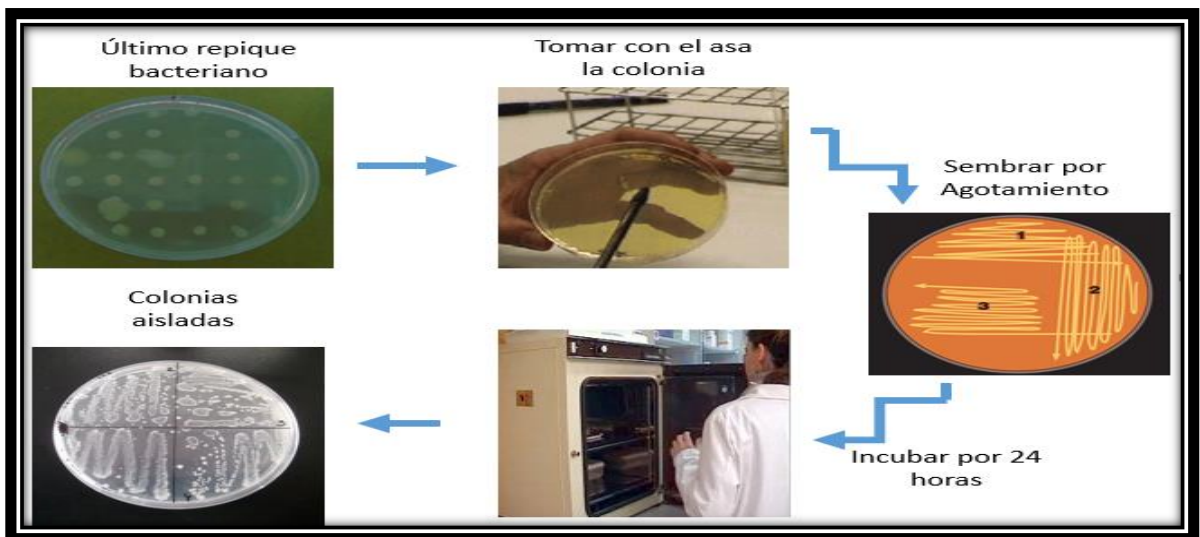


Figura 3-2. Siembra por agotamiento
 Realizado por: NARANJO, C. 2015

2.3.5.4 Tinción Gram del aislado bacteriano puro

Utilizando los clones aislados en el apartado anterior se procedió a realizar la tinción Gram, para verificar su pureza.

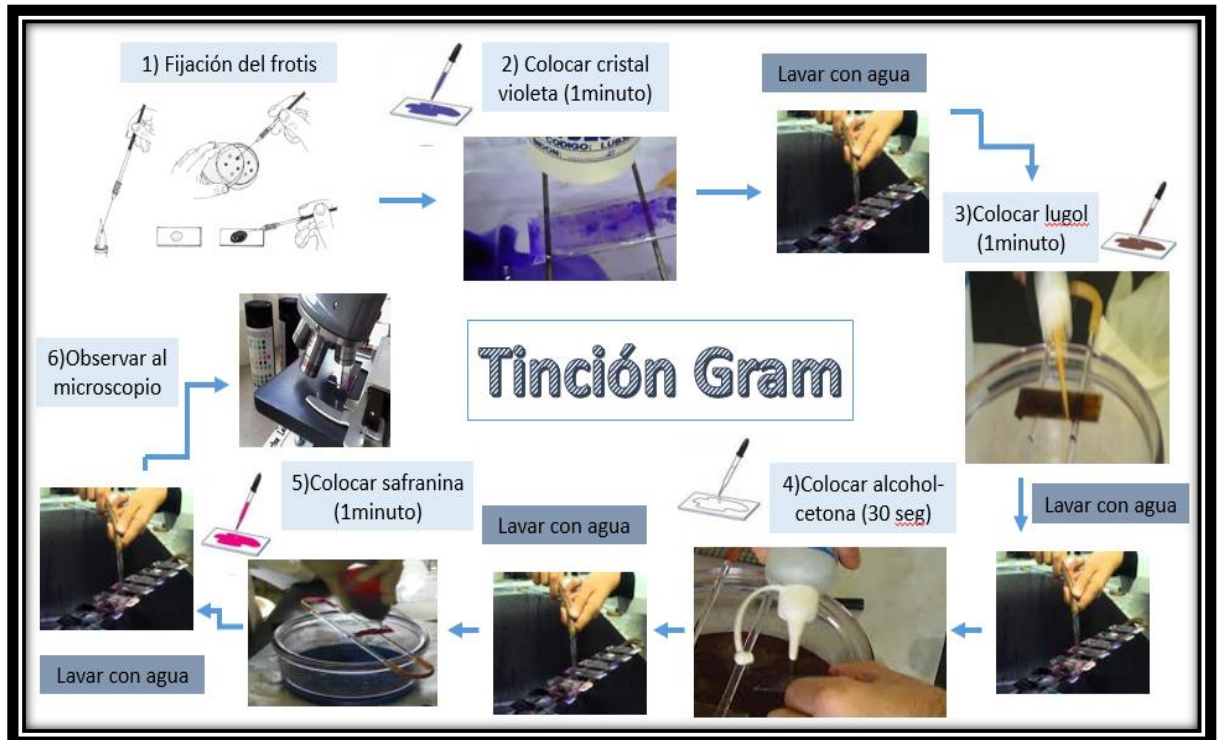


Figura 4-2. Realización de la Tinción Gram

Realizado por: NARANJO, C. 2015

2.3.5.5 Pruebas bioquímicas del aislado bacteriano puro

Las pruebas bioquímicas nos permitieron determinar las características metabólicas de cada uno de los aislados bacterianos puros.

Prueba de la Oxidasa

Se tomó con un palillo de madera una cantidad de muestra bacteriana a partir de una colonia aislada proveniente de un cultivo de 24 horas, la muestra se puso en contacto con la tira y se observó una coloración morada en un lapso no mayor a 30 segundos siendo esto un resultado positivo, de lo contrario el resultado es negativo. (MACFADDIN, J. 2003)

Prueba de la Catalasa

El reactivo utilizado en esta prueba es el peróxido de hidrogeno al 30%, en la técnica se colocó una gota de peróxido en el portaobjetos y posteriormente con un palillo plano se tomó una cantidad de bacterias a partir de una colonia aislada, si se observó el burbujeo significa que hay producción de oxígeno por lo tanto se entiende que hay presencia de la enzima catalasa, hay

bacterias que dan una reacción positiva débil y si no se observó burbujeo esta prueba es negativa. (MACFADDIN, J. 2003)

Prueba O/F

Se utilizaron dos tubos del medio de cultivo, inicialmente el medio es de color verde, se inocularon por punción, llegando hasta el fondo y ascendiendo hacia la superficie. Dejamos solidificar ambos tubos y cubrimos uno de ellos con vaselina estéril (Tubo cerrado), el otro se dejamos expuesto al oxígeno ambiental (Tubo abierto). Incubamos a 35°C durante 48 horas. El resultado que obtuvimos es: si es oxidante da un viraje de color verde a amarillo en el medio que esta sin cubrir con vaselina; si es oxidante y fermentador en ambos tubos el color es amarillo y si es fermentador en el tubo que esta con vaselina va a ser de color amarillo. Si la bacteria no oxida ni fermenta los tubos no darán ningún viraje de color. (MACFADDIN, J. 2003)

Prueba de Kligler

En el medio de cultivo Kligler se inoculó en el agar que esta inclinado, este medio lleva incorporado lactosa al 1% y glucosa al 0,1% y un indicador (rojo de fenol). Este medio es de tonalidad rosado o salmón, se procedió a sembrar en superficie y en profundidad (por picadura). Tras las 24 horas de haber incubado se observó los resultados:

- Fermentación de la glucosa: Viraje al amarillo del fondo.
 - Fermentación de la lactosa: Viraje al amarillo de la superficie.
 - Fermentación de ambas: Viraje al amarillo de todo el tubo.
 - Producción de SH₂: Precipitado negro de sulfuro ferroso.
 - Formación de gas en la fermentación de la glucosa (burbujas o despegamiento del agar).
- (MACFADDIN, J. 2003)

Prueba de Citrato

Se inoculó en el agar inclinado en una sola estría. Se utilizó un cultivo de 24 horas en un medio sólido, hay que tener cuidado de no arrastrar medio de cultivo, ya que se pueden producir falsos positivos por crecimiento a partir del medio de cultivo del inóculo. Se incubó a 35°C durante 24-48 horas. El ensayo es positivo cuando se observó crecimiento a lo largo de la estría, acompañado de un viraje del indicador verde a azul. (MACFADDIN, J. 2003)

Prueba de Ureasa

Se inoculó una porción de la bacteria en el medio de cultivo que se encuentra en pico de flauta. Posteriormente se incubó a 35°C durante 24 horas. Transcurridas las 24 horas se observó que el agar presenta una coloración fucsia en el medio, esto nos indicó que hubo una hidrólisis de urea

con lo que la reacción es positiva. Los degradadores lentos producen coloración parcial (generalmente el pico), los rápidos producen coloración en todo el tubo. Si no hay hidrólisis el medio permanece con el color original (amarillo). (MACFADDIN, J. 2003)

Prueba SIM

Se inoculó el microorganismo por punción con asa de punta. Se incubó a 35°C durante 24 horas y luego de este tiempo se agregaron unas gotas del reactivo de Kovacs dejándolo resbalar por las paredes del tubo. (MACFADDIN, J. 2003)

- Ácido sulfhídrico: Positivo (ennegrecimiento del medio) y si es negativo (sin ennegrecimiento)
- Indol: Positivo (anillo rojo en la superficie del medio) y si es negativo (no se produce color).
- Movilidad: Positiva (los organismos móviles migran de la línea de siembra y se difunden en el medio provocando turbiedad) y si es negativa (crecimiento bacteriano acentuado siguiendo la línea de siembra).

Hidrolisis del almidón

Se preparó el agar luego se agregó almidón al 1%. Una vez solidificado se sembró y se procedió a incubar por 48 horas. Después de este tiempo se realizó la lectura de la prueba agregándole lugol directamente a la placa. La reacción del almidón con el lugol es la formación de una coloración azul-parda. (MACFADDIN, J. 2003)

Hidrolisis de la gelatina

Se preparó agar Mueller Hinton en donde se agregó gelatina al 1%. Se llevó al calor hasta que hierva y luego se esterilizó en autoclave y se distribuyó en placas. En cada placa se sembró y posteriormente se incubó por 48 horas. La lectura se realizó agregando a la placa el reactivo que contenía Cloruro de Mercurio, HCl y agua destilada. (MACFADDIN, J. 2003)

2.3.5.6 Esquemas del Estudio Microbiológico con cada una de las Identificaciones de las Bacterias encontradas en el Estudio

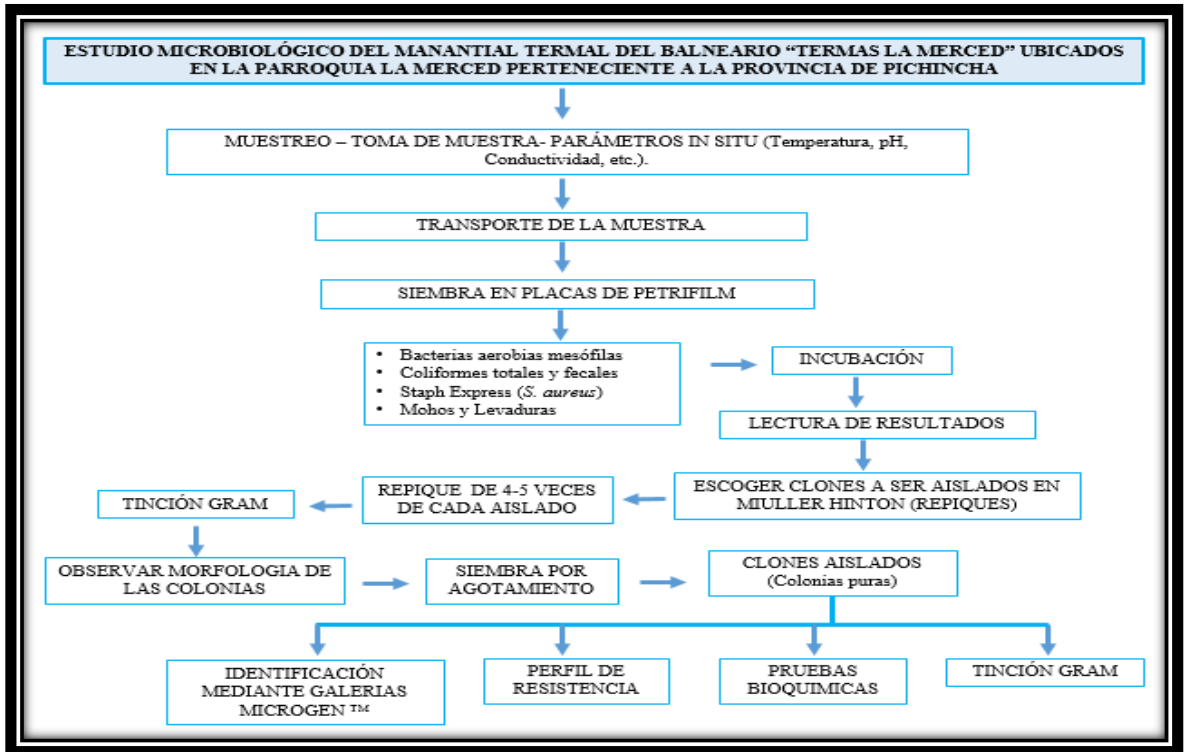


Figura 5-2. Diagrama Metodológico General del Estudio Microbiológico
Realizado por: NARANJO, Carina; 2015

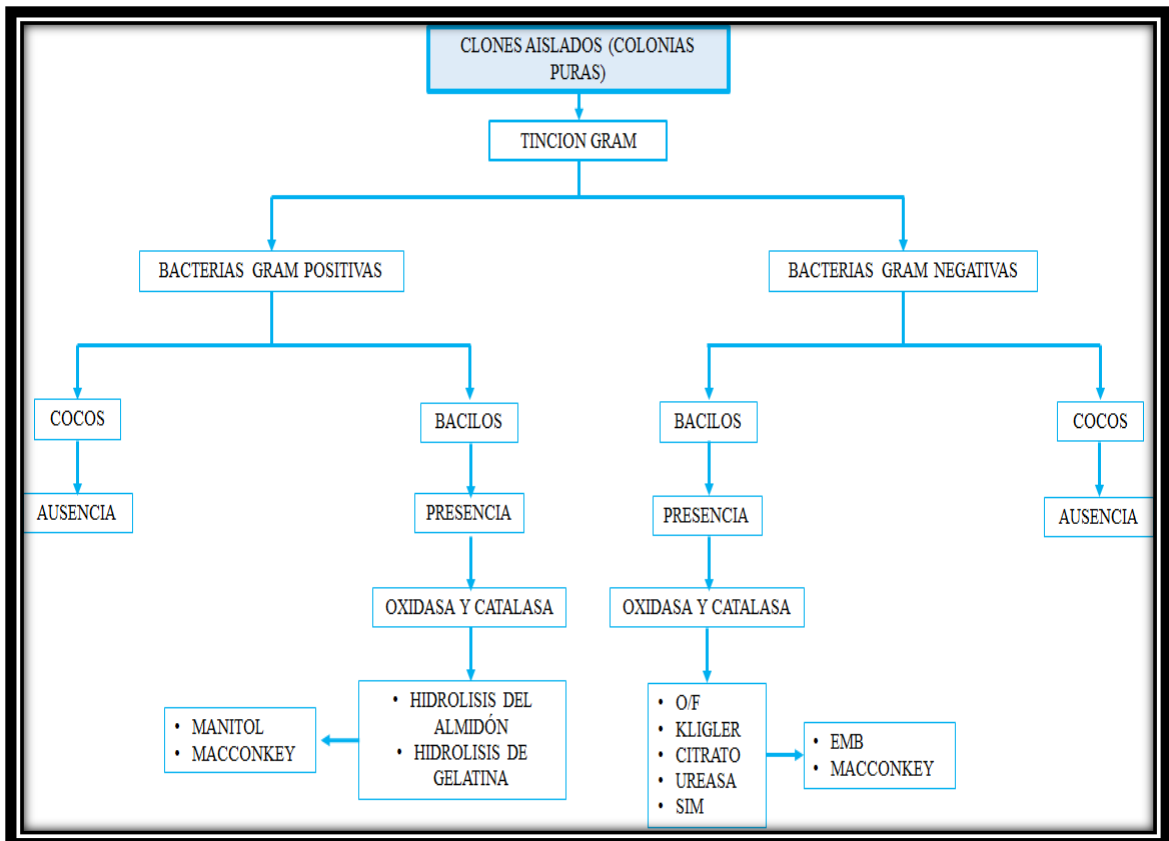


Figura 6-2. Diagrama Metodológico de Clones Aislados (Colonias puras)
Realizado por: NARANJO, Carina; 2015

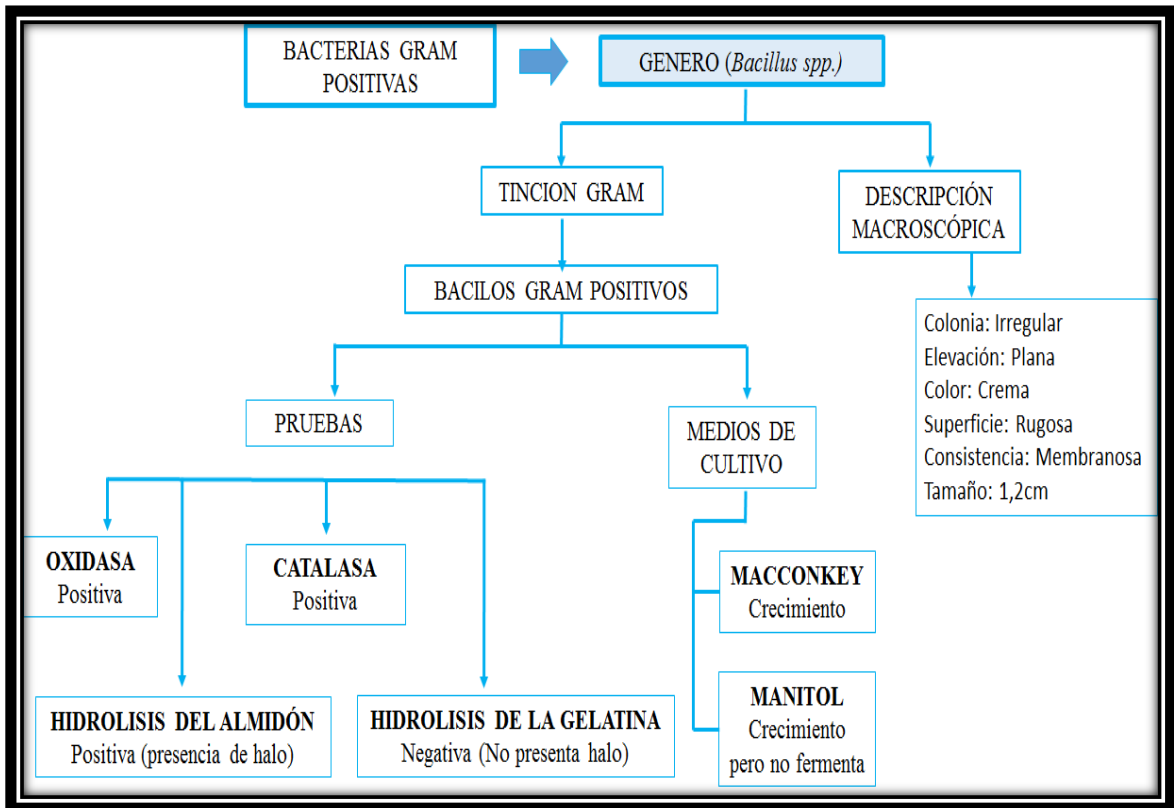


Figura 7-2. Diagrama Metodológico de Identificación de Bacterias Gram Positivas, Género (*Bacillus spp.*)

Realizado por: NARANJO, Carina; 2015

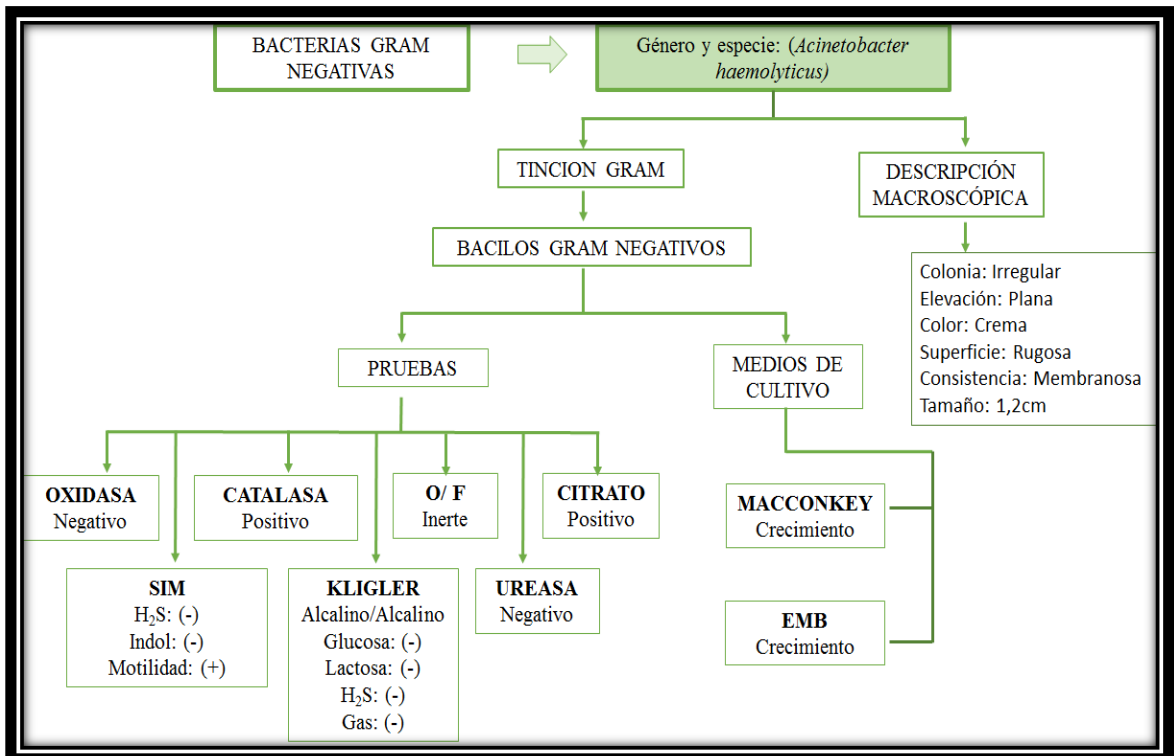


Figura 8-2. Diagrama Metodológico de Identificación de Bacterias Gram Negativas, Género y especie (*Acinetobacter haemolyticus*)

Realizado por: NARANJO, Carina; 2015

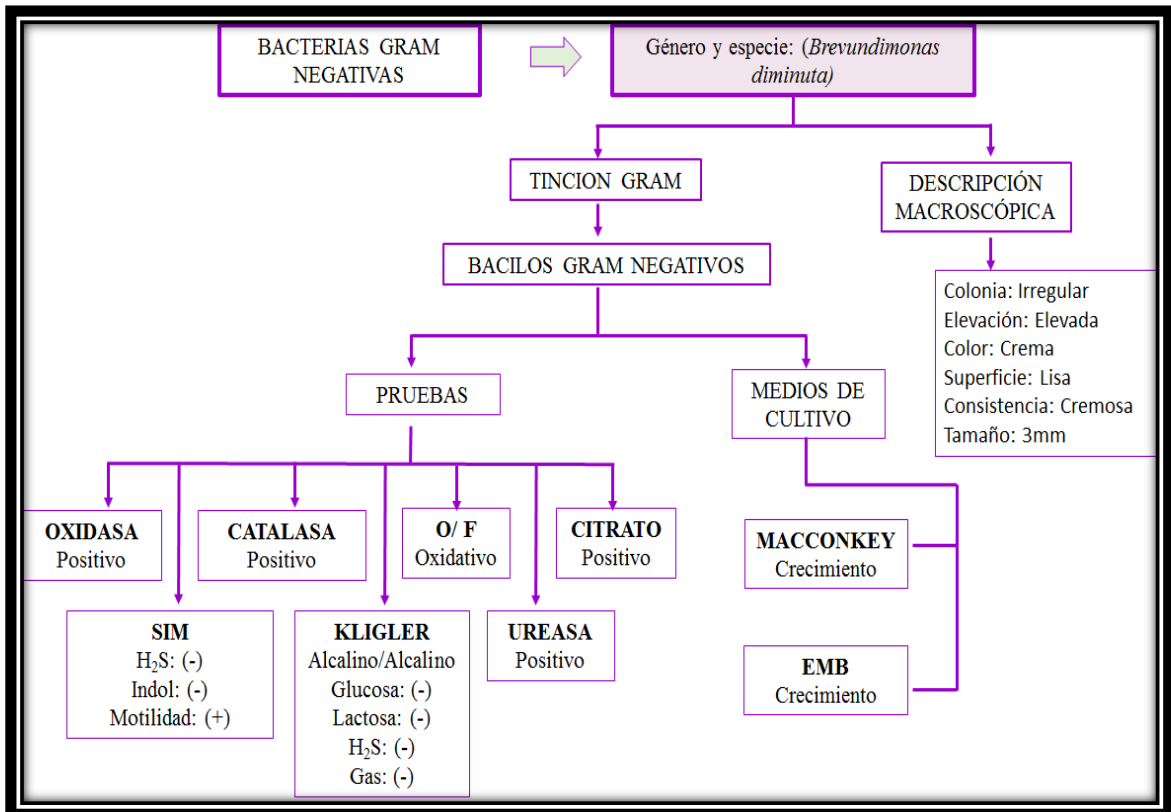


Figura 9-2. Diagrama Metodológico de Identificación de Bacterias Gram Negativas, Género y especie (*Brevundimonas diminuta*)

Realizado por: NARANJO, Carina; 2015

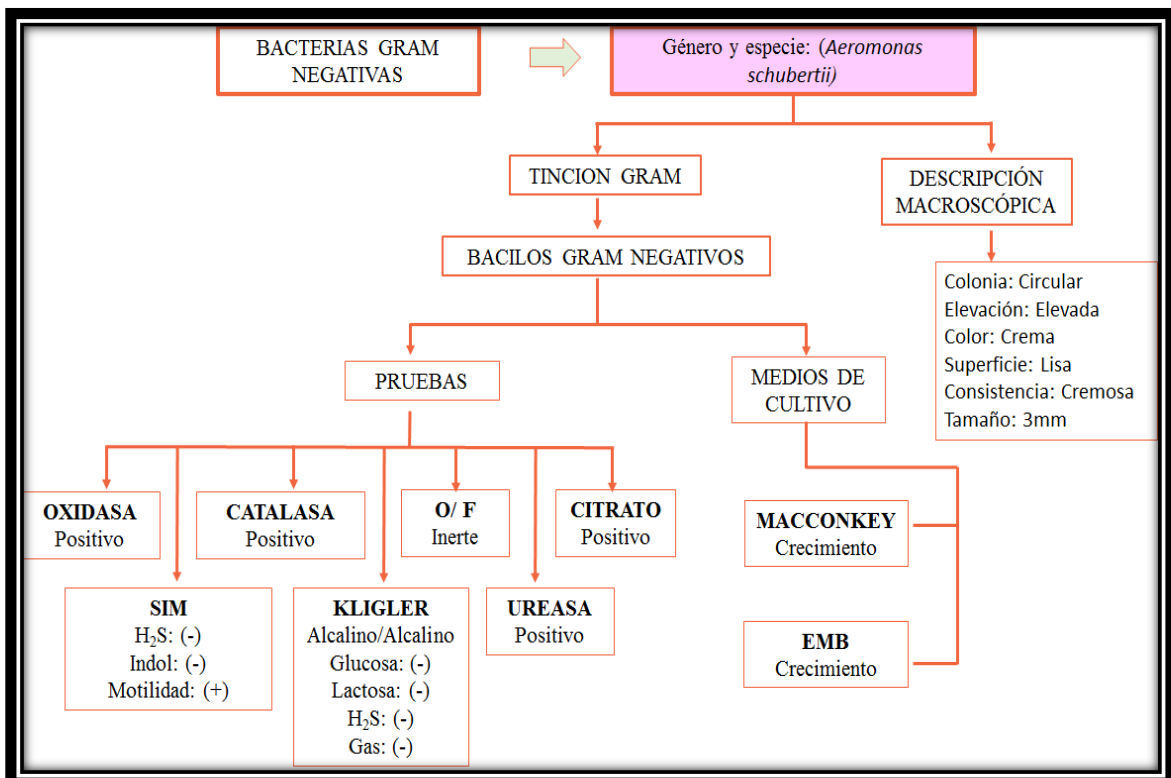


Figura 10-2. Diagrama Metodológico de Identificación de Bacterias Gram Negativas, Género y especie (*Aeromonas schubertii*)

Realizado por: NARANJO, Carina; 2015

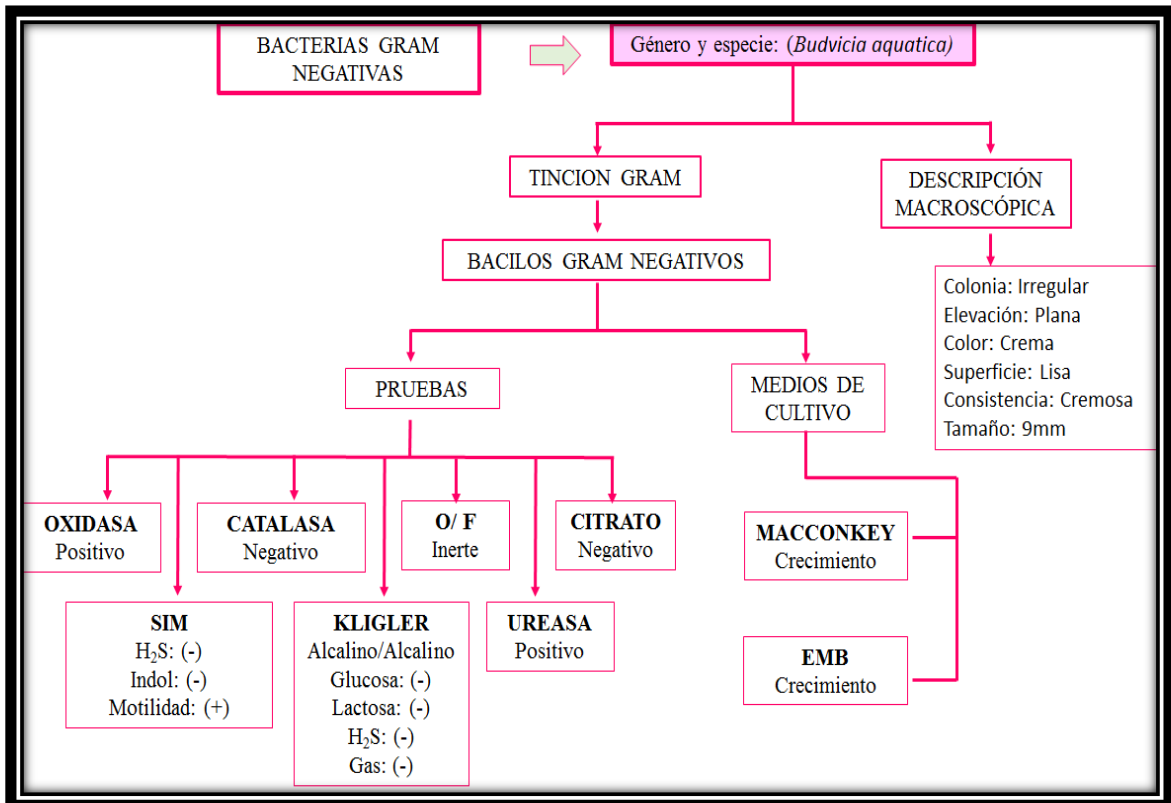


Figura 11-2. Diagrama Metodológico de Identificación de Bacterias Gram Negativas, Género y especie (*Budvicia aquatica*)

Realizado por: NARANJO, Carina; 2015

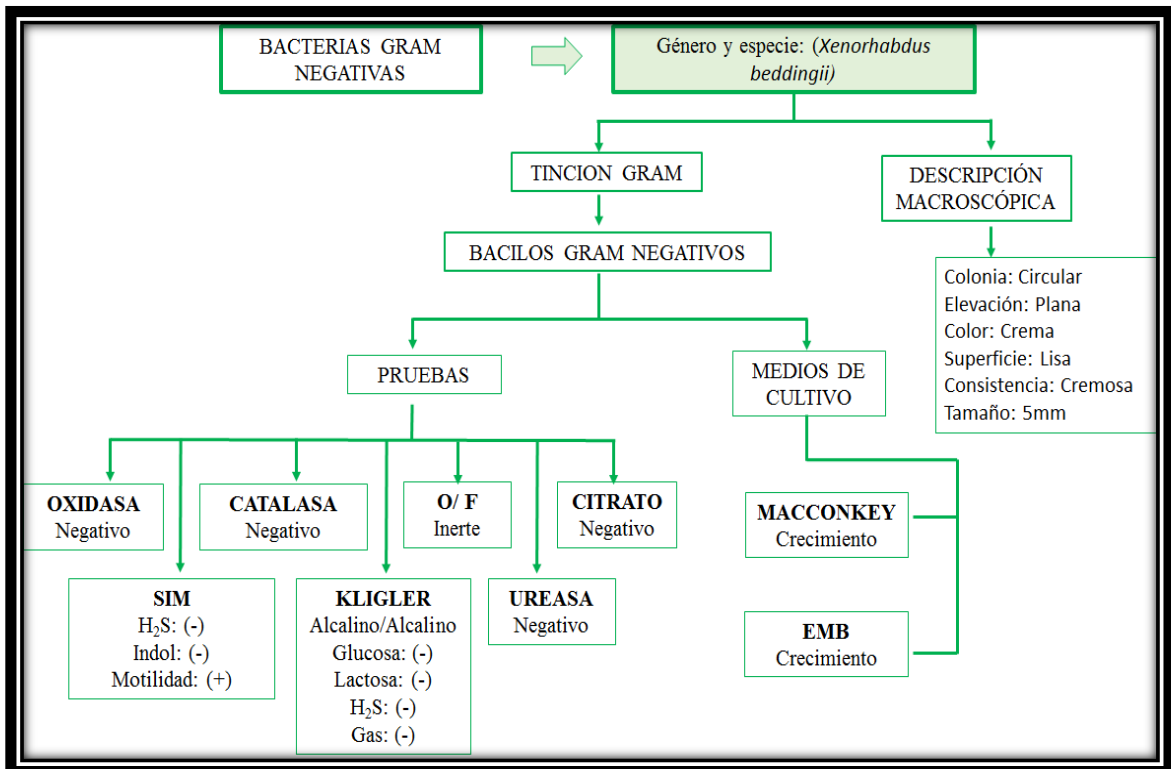


Figura 12-2. Diagrama Metodológico de Identificación de Bacterias Gram Negativas, Género y especie (*Xenorhabdus beddingii*)

Realizado por: NARANJO, Carina; 2015

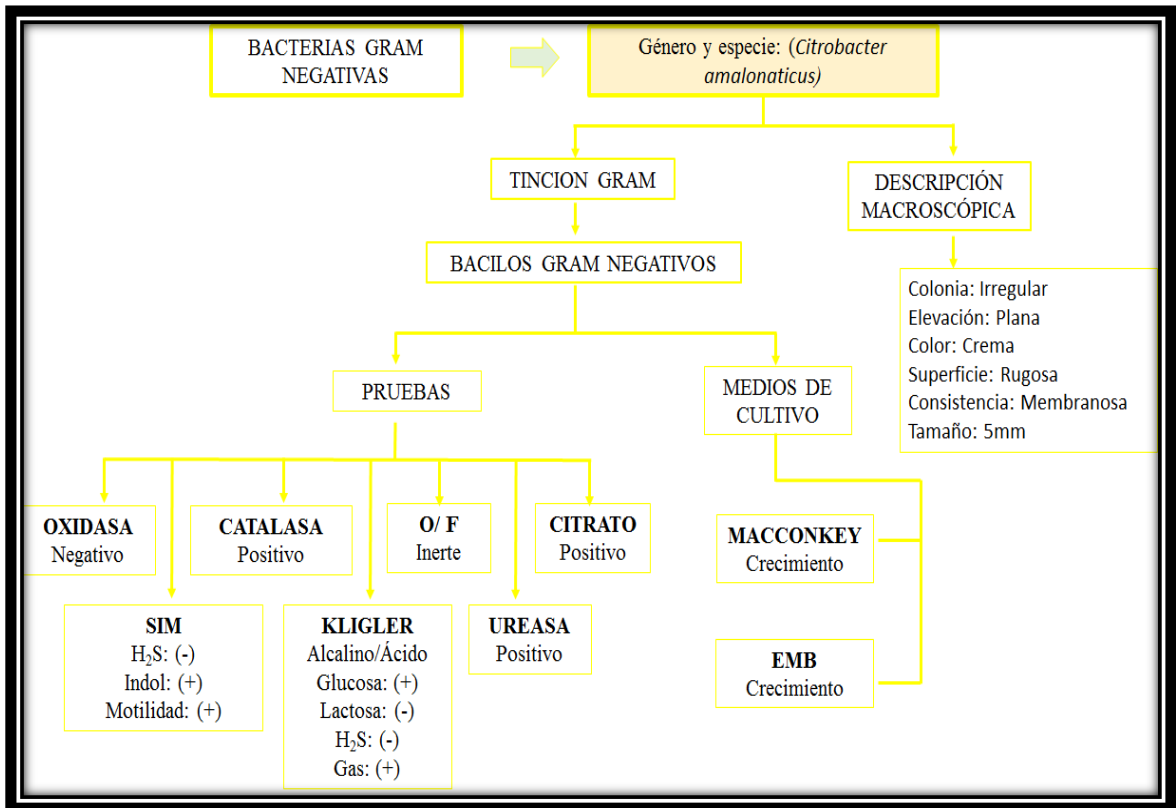


Figura 13-2. Diagrama Metodológico de Identificación de Bacterias Gram Negativas, Género y especie (*Citrobacter amalonaticus*)

Realizado por: NARANJO, Carina; 2015

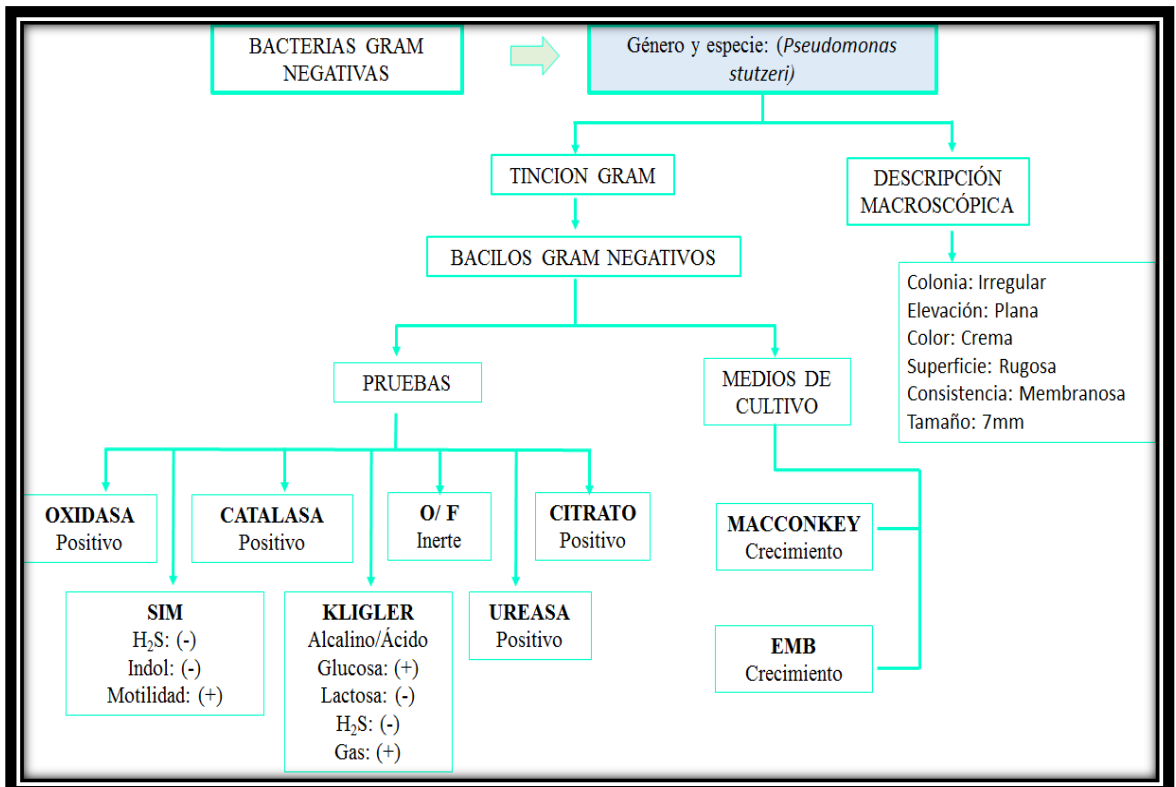


Figura 14-2. Diagrama Metodológico de Identificación de Bacterias Gram Negativas, Género y especie (*Pseudomonas stutzeri*)

Realizado por: NARANJO, Carina; 2015

2.3.5.7 Pruebas de resistencia antibiótica

La prueba se sembró en el medio Mueller Hinton, se colocó una colonia bacteriana de 24 horas, se ajustó la turbidez hasta obtener una concentración de 0,5 en la escala de McFarland. La siembra se realizó mediante un hisopo estéril, se colocó el hisopo en el medio extendiéndola por toda la superficie procurando que no queden espacios sin cubrir. Una vez que se sembró, en la placa se colocan los discos de los antibióticos con la ayuda de pinzas metálicas esterilizadas, hay que asegurarse que los discos estén adheridos en el medio realizando una ligera presión para que queden adheridos, la distancia de cada disco con el otro debe ser no menor a 24mm desde el centro del antibiótico al otro. La placa se incubó durante 24 horas a 35°C. Posteriormente se leyeron los resultados midiendo el diámetro de los halos de inhibición que aparecen alrededor de los discos. Se valora la efectividad de los mismos, bajo el criterio: si existe la presencia de un halo de inhibición independiente del tamaño este sea como resultado será sensible y si no hay presencia de halo corresponderá a que la bacteria es resistente. (VALERA, R., et al).

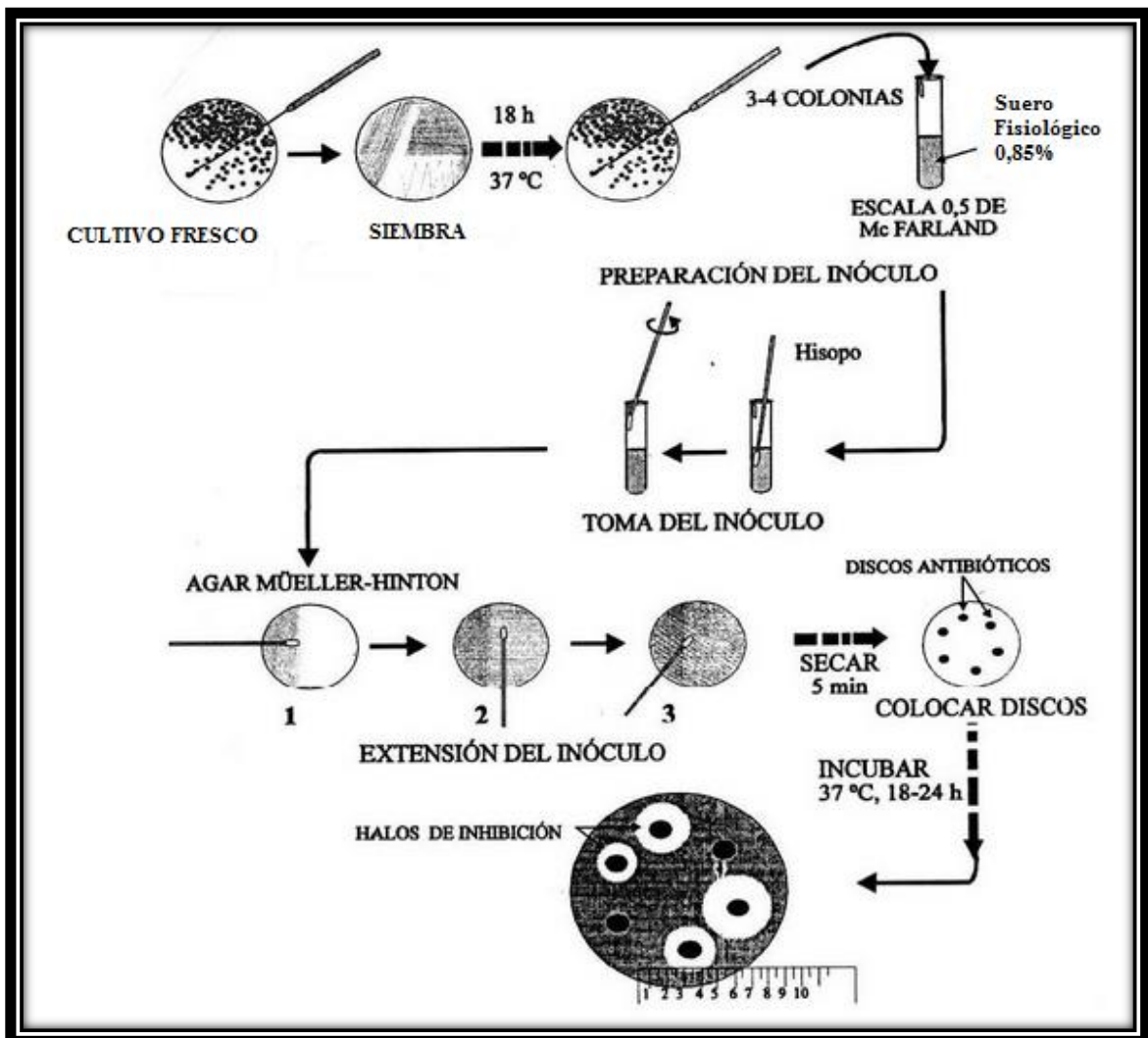


Figura 15-2. Procedimiento por el Método difusión en agar

Fuente: http://campus.usal.es/~micromed/Practicas_odontologia/unidades/labv/LabMicro/Antibiograma.html

2.3.5.8 Prueba de antibiograma con EDTA

La prueba se realizó utilizando una placa de agar Mueller-Hinton, esta placa se sembró con un inóculo estandarizado (0,5 McFarland) y se colocó los discos de antibióticos en la placa, posteriormente se impregnó con 10µl de EDTA (0,5M), para obtener una concentración final en el disco de 750µg/ml de EDTA, luego se colocó a cada lado del disco de EDTA un disco de imipenem y meropenem respectivamente, a una distancia de 15 mm centro-centro, se incubó a 35°C por 24 horas, luego de la incubación, se realizó la lectura de la prueba. (GRANADO, J. 2010)

2.3.5.9 Ensayo de actividad antibacteriana

Se ensayó la actividad bacteriana en las cepas aisladas mediante la técnica de difusión en disco, en donde se realizó un tapiz de las cepas ATCC las que usamos fueron la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 se utilizó el agar Mueller Hinton, luego se procedió a colocar en cada caja los clones aislados. Las placas se incubaron a 35°C por 24 horas, posteriormente medimos el diámetro de la zona de inhibición.

2.3.5.10 Identificación de las colonias bacterianas puras por medio de las galerías de MicrogenTM

Hay que tener en cuenta que se hizo la prueba de la oxidasa antes de utilizar GN A o a su vez las dos GN A como GN B. (MEDICA-TEC, 2004)

Se emulsificó la colonia obtenida de un cultivo de 18-24 horas en 3 mL de solución salina estéril 0.85% para la tira GN A. Si se van a inocular ambas tiras, GN A y GN B, la colonia se debe emulsificar en 3-5mL de solución salina estéril 0.85%. Mezclar bien. Se quitó la lámina adhesiva que sella los pocillos cuidadosamente. NO se debe tirar la tira adhesiva, ya que posteriormente se vuelve a utilizar. Usando una pipeta automática, se añadió 100µL de la suspensión bacteriana a cada pocillo. Después de la inoculación, se cubrió los pocillos 1,2 y 3 (tira GN A) y pocillos 20 y 24 (tira GN B) con 3-4 gotas de aceite mineral. (NO añadir aceite en el pocillo 20 si el organismo aislado es oxidasa positivo). Estos pocillos están marcados con un círculo negro alrededor para facilitar su identificación. Posteriormente se selló nuevamente con la cinta adhesiva que se había retirado antes, luego se incubó a 35-37°C. Las tiras GN A y GN B se leyeron después de 18-24 horas de incubación para las Enterobacteriaceae, y tras 48 horas para los aislados oxidasa positivos. (MEDICA-TEC, 2004)

CAPITULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Parámetros In situ

En la medición de los parámetros fisicoquímicos, se realizaron dos registros en cada punto de muestreo (piscina y pozo). Teniendo en cuenta que las aguas mineromedicinales desde el punto de vista fisicoquímico son sistemas heterogéneos.

Tabla N° 1-3. Resultado de las determinaciones de los parámetros in-situ en el manantial termal del balneario “Termas La Merced”

MUESTRA	PARÁMETROS IN SITU				
	Temperatura ambiente (°C)	Temperatura Muestras (°C)	ppm	pH	Conductividad (μS/cm)
Piscina	10	32,9	520	6,6	1140
Pozo	10	34,5	521	6,5	1100
PROMEDIO	10	33,7	520,5	6,6	1120

Realizado por: NARANJO, C., 2015

La recolección de las muestras de agua se realizó en dos puntos (pozo y la piscina), las muestras fueron tomadas en horas de la mañana (06:40 AM), sin la presencia de lluvia, la temperatura ambiental en el muestreo fue de 10°C. La toma de muestra de agua se llevó a cabo utilizando un envase estéril de boca ancha de plástico con una capacidad de 120mL.

En la tabla 1-3, se puede observar que los valores de temperatura, ppm, pH y conductividad, tanto del pozo como la de la piscina, son similares, a los estudios de las aguas termo-minerales del Ecuador realizados por el INAHMI, observándose en el caso de la temperatura es de 34,8°C, al comparar con lo reportado por el INAMHI (temperatura) es pequeña la diferencia, los valores del

pH promedio del Balneario fueron de 6,6, estas aguas son de pH ligeramente ácido de modo que al comparar con el estudio realizado por el INAMHI en el que reportan un pH de 6, 58, podemos decir que son similares los valores obtenidos en este estudio. En cuanto a los sólidos disueltos y la conductividad eléctrica los valores obtenidos fueron (521 ppm y 1120), al comparar estos valores con un estudio reportado por el INAMHI en el año 2013. Se observa que existen pequeñas diferencias que pueden deberse a factores como la presión del equipo, el clima, variaciones normales de la fuente, entre otras.

De acuerdo la temperatura obtenida en la piscina y en el pozo (tabla N° 1-3), podemos afirmar que las aguas termo-minerales del Balneario “Termas La Merced” son termales ya que existe una diferencia de 23,7°C entre la temperatura ambiente y la temperatura del agua.

3.2 Recuento Bacterias Aerobias Mesófilas

El conteo se realizó por el método de Petrifilm para aerobios mesófilos, para ello se sembraron las muestras de la piscina y del pozo y luego de 48 horas tras incubarse a 35°C, obtuvo los siguientes resultados (tabla N° 2-3)

Tabla N° 2-3. Resultado del recuento de Bacterias aerobias mesófilas en el manantial termal del balneario “Termas La Merced”

SITIO	NÚMERO DE UFC/mL	MEDIA	DESVIACIÓN	VARIANZA
		UFC/mL (x)	ESTÁNDAR (Ds)	
Piscina	Muestra 1	2,00E+03	1154,700538	1333333,333
	Muestra 2	2,00E+03		
Pozo	Muestra 1	0,00E+00	0	
	Muestra 2	0,00E+00		
PROMEDIO BALNEARIO		1x10 ³		

Realizado por: NARANJO, C., 2015

En la tabla N° 2-3 se muestra que no se detectó la presencia de bacterias mesófilas en el pozo, en cambio en la piscina el valor obtenido fue de 2,00 x 10³ UFC/mL, indicando que este sitio presenta una alta carga microbiana, esto puede deberse a que la piscina está expuesta al ambiente y al uso constante de los bañistas.

En el caso del pozo no se encontró ningún crecimiento lo cual es similar a lo reportado por De la Rosa, en el 2004, quien menciona que en condiciones naturales las aguas subterráneas contienen poca cantidad de microorganismos (debido a la escasez de nutrientes, el escaso o nulo aporte energético). Cuando el hombre altera el hábitat va a introducir sustancias extrañas y esto provoca una proliferación anormal de microorganismos, pudiendo ser el caso del Balneario “Termas La Merced” donde bajo las condiciones del estudio no se encontró ningún crecimiento en el pozo mientras que en la piscina se obtuvo un alto número de bacterias (tabla N° 2-3).

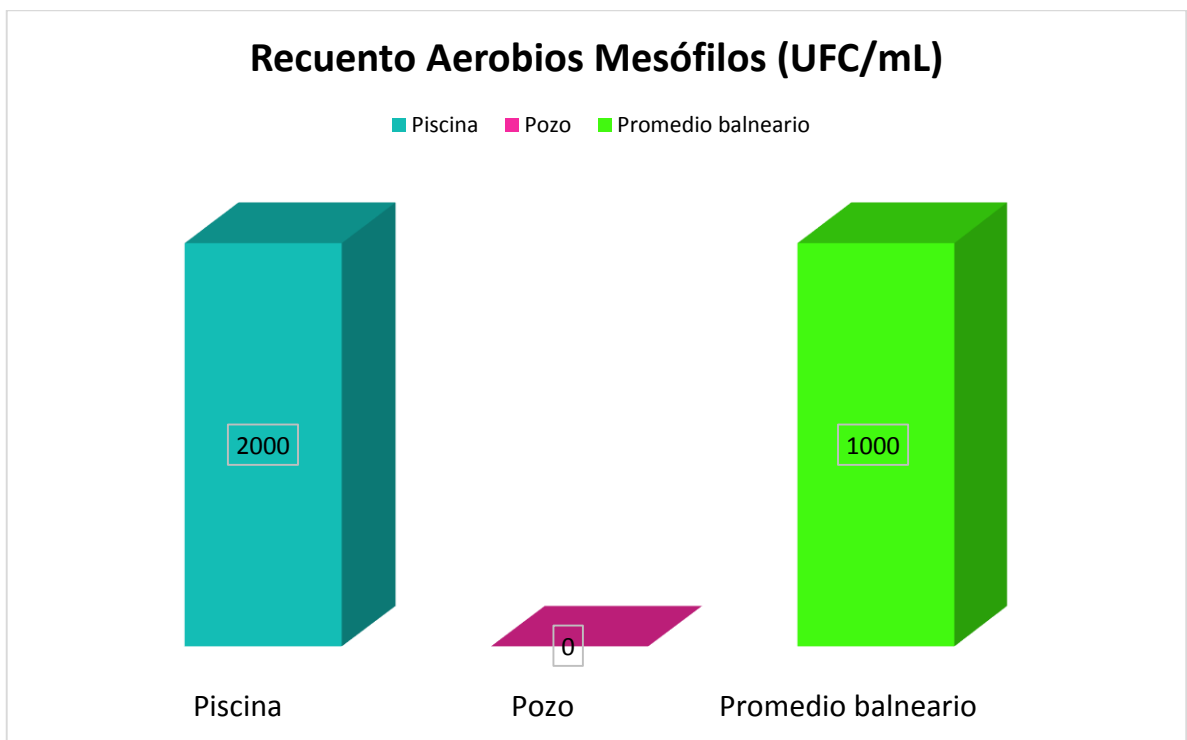


Gráfico 1-3 Recuento de Bacterias Aerobias Mesófilas del manantial termal del balneario “Termas La Merced”

Realizado por: NARANJO, C., 2015

Los resultados obtenidos en el recuento de las bacterias aerobias mesófilas del Balneario “Termas La Merced” muestran resultados opuestos; debido a que en el pozo no se obtuvieron UFC/mL, en el caso de la piscina el valor alcanza 2×10^3 UFC/mL (tabla N° 2-3), en el caso del pozo está de acuerdo con lo reportado por De la Rosa, Ma. Carmen. et al, en el 2004, quien indicó que en condiciones naturales las aguas subterráneas poseen una baja cantidad de microorganismos debido a la escasa cantidad de nutrientes que poseen. Sin embargo el resultado obtenido para la piscina (tabla 2-3 y gráfico 1-3) está muy por encima de los valores reportados por De la Rosa, Ma. Carmen. et al, en el 2004.

Mosso. et al, 2008, realizaron un estudio de la microbiota de los manantiales mineromedicinales del Balneario de Valdelateja, en donde los resultados obtenidos en ese balneario son inferiores a 100 UFC/mL bacterias heterótrofas y oligotrofas aerobias viables y de bacterias esporuladas es inferior a 5 UFC/mL. Esto nos indica que en España realizan una buena protección hacia los balnearios desde el punto de emergencia hasta sus piscinas. En cambio en el balneario “Termas La Merced” se necesita hacer un control exhaustivo en la piscina debido a que está por encima de los valores reportados, por lo contrario en el pozo hay ausencia de bacterias aerobias mesófilas.

En el 2009, De la Rosa, Ma. Carmen. et al, realizaron estudios acerca de la Microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario de Alicún de las Torres, revelando como resultado que el número de bacterias heterótrofas y oligotrofas aerobias viables es inferior a 100 UFC/mL. En este balneario la temperatura de 34°C al comparar la temperatura de este estudio con el nuestro podemos decir que la temperatura es similar a la del pozo del balneario “Termas La Merced”. En el estudio del Balneario de Alicún de las Torres hay un perímetro de protección, sin embargo en nuestro estudio los valores no se asemejan a los reportados en el estudio Balneario de Alicún de las Torres en el caso de la piscina ya que los valores son superiores.

Mosso y De la Rosa, en el 2011, estudiaron la microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario de Baños de la Concepción de Villatoya (Albacete), aquí se estudió los puntos de emergencia de tres manantiales en donde los resultados obtenidos fueron inferiores a 20 UFC/mL en bacterias heterótrofas y oligotrofas aerobias viables, esto nos visualizó que la normativa de España es buena y que los balnearios cumplen a cabalidad con las normas, dando como resultado que todos los manantiales de ese país son adecuados y garantizados para el uso de los bañistas.

De la Rosa. et al, en el 2013, realizó un estudio de microbiología del agua mineromedicinal del Balneario Raposo, en este estudio los resultados obtenidos son muy bajos dando 5 UFC/mL de bacterias heterótrofas y esporuladas, la protección de ese manantial es buena y adecuada. Lo que indica que en nuestro caso se debería realizar un protocolo de limpieza y desinfección de la piscina y de las personas que realizan esta labor para de esta manera bajar la cantidad de bacterias aerobias mesófilas.

El hecho de que la carga de bacterias aerobias mesófilas en la piscina sea alta con relación a lo encontrado en el pozo, indica que los microorganismos presentes corresponden a contaminantes incorporados al agua cuando se trasvasa a la piscina y cuando el agua está en ella, este hecho nos indica la necesidad de realizar acciones para disminuir la alta carga bacteriana encontrada en la piscina.

3.3 Recuento de *E. coli* / Coliformes totales

La estimación del número de *E. coli*/coliformes totales se realizó por el método de Petrifilm, se sembró en muestras de la piscina y del pozo, obteniéndose los valores mostrados en la tabla N° 3-3.

Tabla N° 3-3. Resultado del recuento de *E. coli* /Coliformes totales del manantial termal del balneario “Termas La Merced”

SITIO		C.T UFC/m L	<i>E. coli</i> UFC/m L	MEDIA <i>E.coli</i> UFC/mL (x)	MEDIA C.T UFC/m L (x)	DESVIACIÓN ESTÁNDAR (Ds)	VARIANZA
Piscina	Muestra 1	42	1	3	57	35,11409973	1233
	Muestra 2	72	4				
Pozo	Muestra 1	0	0	0	0		
	Muestra 2	0	0				
PROMEDIO BALNEARIO				1,5	28,5		

C.T: Coliformes totales

Realizado por: NARANJO, C., 2015

La evaluación del contenido de coliformes totales y *E. coli* (tabla N° 3-3) en las muestras obtenidas del pozo mostró que no existe contaminación de coliformes totales y fecales sin embargo en el caso de las muestras de la piscina se encontraron valores de hasta 72UFC/mL coliformes totales y valores de hasta 4UFC/mL de coliformes fecales.

En las coliformes fecales encontradas en la piscina se obtuvo un número menor, el cual aunque muy bajo es significativo.

La determinación de coliformes totales nos indica de manera muy superficial la existencia de contaminación, ya que los coliformes son un grupo muy heterogéneo de bacterias que agrupa a bacilos Gram negativos fermentativos, como *E. coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, etc. cuya procedencia puede ser fecal (se encuentran en el intestino del hombre y de los animales), pero también pueden proceder del suelo, polvo y agua. Por este motivo para determinar si la

contaminación es de origen fecal se recurre a los coliformes fecales (*E.coli*) donde su presencia en el agua nos va indicar que hay contaminación.

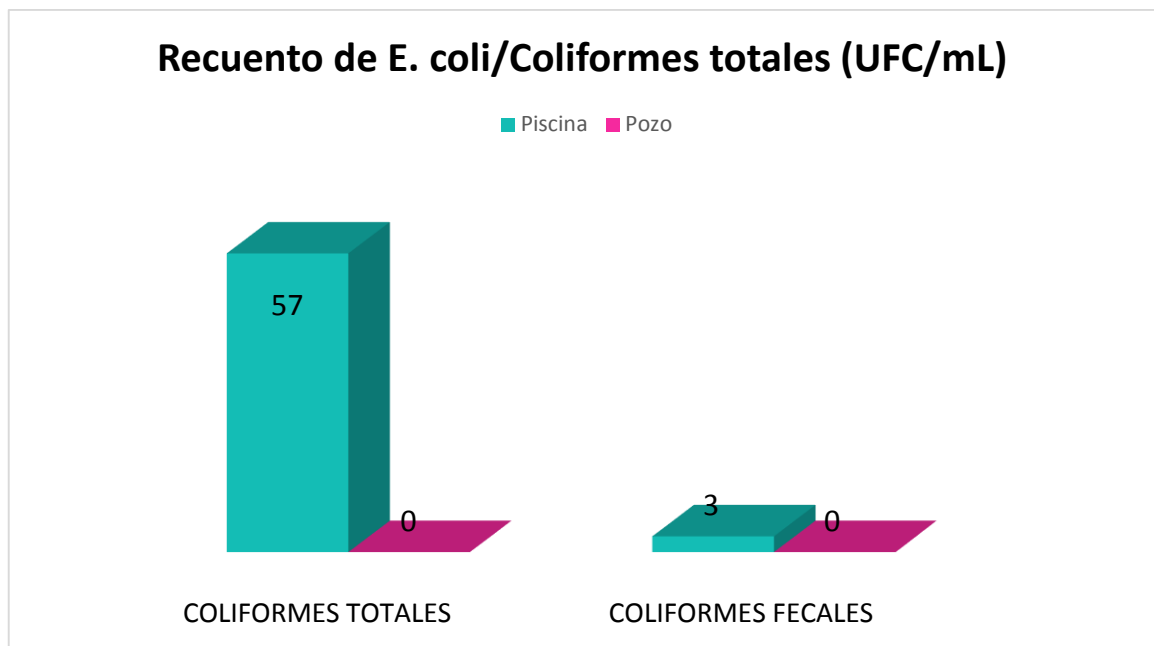


Gráfico 2-3 Recuento de *E. coli* /Coliformes totales del manantial termal del balneario “Termas La Merced” ubicado en la parroquia La Merced.

Realizado por: NARANJO, C., 2015

En el gráfico N°2-3, se indica la ausencia en el recuento de coliformes totales y de coliformes fecales en el pozo del balneario, sin embargo en la piscina si hay presencia de coliformes totales con un promedio de 5700/100mL, y de coliformes fecales el promedio que fue de 3 UFC/mL, por lo tanto existe en la piscina una contaminación tanto de coliformes totales como fecales. Esto concuerda con el estudio de microorganismos patógenos en la fuente termal de O Tinteiro en Ourense realizada por Vendrell, M. C., et al en 1998, quienes reportan que en un total de seis muestras la fuente termal O Tinteiro encontraron la presencia de coliformes totales en cuatro muestra. Al cortejar el estudio de Vendrell, M. C., et al con nuestro estudio observamos que es similar por la presencia de coliformes totales; en el 2004, De la Rosa, Ma. Carmen., et al, investigaron la microbiota del agua mineromedicinal de los Balnearios de Jaraba, no reportaron indicadores fecales (*Escherichia coli*, enterococos y *Clostridium sulfito-reductores*), por lo tanto este balneario cumple con la normativa de aguas de consumo humano. (BOE 45, 2003); Mosso, Ma, Ángeles., et al, en el 2008, realizaron un estudio de la microbiota de los manantiales mineromedicinales del Balneario de Valdelateja, donde los resultados fueron que no hay la presencia de indicadores fecales (*Escherichia coli*, enterococos, *Clostridium sulfito-reductores* y *Clostridium perfringens*), en 100 mL de agua, de modo que las muestras cumplen con la normativa de aguas de consumo humano. (BOE 45. 2003). Estos valores son similares a los

reportados en nuestro estudio en el caso del pozo. En el manantial del Balneario de Valdelateja se han encontrado coliformes totales (8UFC/100 mL) pertenecientes a las especies *Citrobacter freundii* y *Enterobacter amnigenus*, la presencia de estas especies en el agua y en ausencia de *E. coli* no indican contaminación fecal y no suponen que exista un riesgo para la salud de los bañistas. En nuestro caso de la piscina del balneario se obtuvo tanto coliformes totales como coliformes fecales.

De acuerdo al Reglamento del régimen Técnico-Sanitario de Piscinas, Boletín Oficial de Canarias No 38, donde se indica que los valores de coliformes fecales deben ser nulos y el de las coliformes totales 10 UFC/100ml, el valor obtenido por nosotros en la piscina tanto para coliformes fecales como para coliformes totales están muy por encima del valor permitido para aguas de piscina según el Reglamento del régimen Técnico-Sanitario de Piscinas.

3.4 Recuento de *Staphylococcus aureus*

El conteo se realizó por el método de Petrifilm, en este caso usamos las placas Staph express, para ello se sembraron 1mL las muestras de la piscina y del pozo, luego de 48 horas tras a ver incubado a 35 °C.

La evaluación de la presencia de *Staphylococcus aureus* en el Balneario “Termas La Merced” mostró la ausencia de esta bacteria tanto en la fuente como en la piscina, nuestros resultados concuerdan con lo reportado por De la Rosa, Ma. Carmen., et al, en el 2004, quienes realizaron el estudio de la microbiota del agua mineromedicinal de los Balnearios de Jaraba, reportando que no encontraron bacterias patógenas (*Staphylococcus aureus*), en una muestra de 250 mL de agua, por lo que cumplen con la normativa de aguas de consumo humano. (BOE 45. 2003). Sin embargo reportaron un pequeño número de bacterias halófilas facultativas, correspondiente al género *Staphylococcus*; Mosso, Ma. Ángeles., et al, en el 2006 realizaron el estudio de la microbiota del agua mineromedicinal del Balneario Cervantes, reportando que en ninguna muestra detectaron bacterias patógenas (*Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila* y *Staphylococcus aureus*) en 250 mL de agua; en el 2007, De la Rosa, Ma. Carmen., et al, en el estudio de la microbiota de los manantiales mineromedicinales del Balneario Puente Viesgo, reportaron que tanto en el punto de emergencia del manantial como en la fuente de bebida (uso de los bañistas por vía oral), no hay presencia de bacterias patógenas (*Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila* y *Staphylococcus aureus*) en 250 mL de agua; De la Rosa, Ma. Carmen., et al, en el 2009, investigaron la microbiota de los manantiales mineromedicinales del Balneario de Alicún de las Torres, como resultado obtuvieron baja cantidad del género *Staphylococcus*, este género es ubicuo y consiguen vivir en concentraciones más o menos

elevadas de sales por lo que se han detectado en aguas mineromedicinales, su presencia es normal en este tipo de ambientes salinos. Sin embargo no se reportaron bacterias patógenas (*Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila* y *Staphylococcus aureus*) en 250 mL de agua. El que no se haya obtenido la presencia de *Staphylococcus* en nuestro estudio indica que el balneario no constituye ningún riesgo sanitario, teniendo en cuenta que estas bacterias pueden transmitirse a los bañistas a través de vía oral, respiratoria y tópica provocando infecciones a nivel de piel, vías urinarias, oculares, etc. Sin embargo la escasa presencia de estas bacterias en los manantiales puede deberse a su baja salinidad y este tipo de especies pueden llegar ya sea por el aire, suelo, etc.

3.5 Recuento de Mohos y levaduras

La estimación del número de mohos y levaduras se realizó por el método de Petrifilm, se sembró muestras de la piscina y del pozo observándose los valores mostrados en la tabla N° 4-3

Tabla N° 4-3. Resultado del recuento de Mohos y levaduras (UFC/mL) en el manantial termal del balneario “Termas La Merced”

SITIO		Mohos	Levaduras	MEDIA M (x)	MEDIA L(x)	DESVIACIÓN ESTÁNDAR (Ds)	VARIANZA
Piscina	Muestra 1	0	5	0	7	3,41216312	11,6428571
	Muestra 2	0	9				
Pozo	Muestra 1	0	0	0	0		
	Muestra 2	0	0				
PROMEDIO BALNEARIO				0	3,5		

M: Mohos

L: Levaduras

Realizado por: NARANJO, C., 2015

En la tabla N° 4-3 y gráfico 3-3, se muestra que no se detectó la presencia de mohos y levaduras en el pozo del balneario “Termas La Merced”, sin embargo en la piscina aunque no se observa la

presencia de mohos si hay presencia de levaduras (70/100mL), este resultado puede deberse al uso constante de los bañistas, ya que la presencia tanto de mohos como de levaduras en este tipo de aguas es poco habitual, pudiendo producir a infecciones en las vías urinarias, dermatitis o eczemas en las personas que utilizan la piscina.

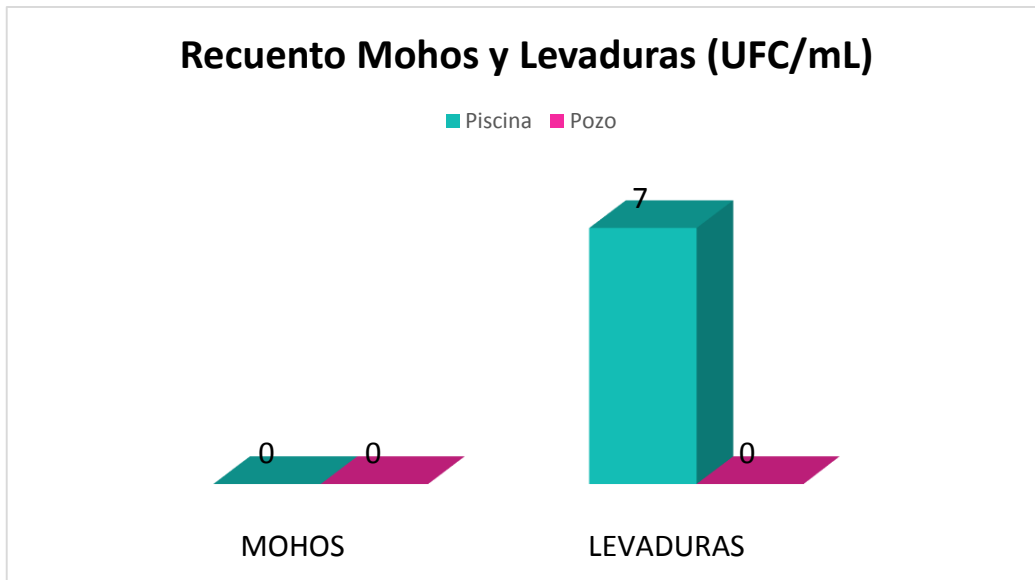


Gráfico 3-3 Recuento de Mohos y Levaduras del manantial termal del balneario “Termas La Merced”

Realizado por: NARANJO, C., 2015

En el caso de las muestras de mohos nuestros resultados no coinciden con los reportados por De la Rosa, Ma. Carmen., et al, en el 2004, quienes en un estudio de la microbiota del agua mineromedicinal de los Balnearios de Jaraba, reportaron el aislamiento de hongos filamentosos (< 10/100 ml) y dos cepas de levaduras; Mosso, Ma. Ángeles; et al, en el 2006, realizaron un estudio de la microbiota del agua mineromedicinal del Balneario Cervantes, reportando un pequeño número (20 UFC/100 mL) de hongos; De la Rosa, Ma. Carmen., et al, en el 2009, investigaron la microbiota de los manantiales mineromedicinales del Balneario de Alicún de las Torres, reportando que los hongos filamentosos encontrados procedían del suelo; De la Rosa, Ma. Carmen., et al, en el 2013, indican que el bajo número de mohos encontrado en este tipo de aguas proviene del suelo y se adaptan con facilidad a las condiciones de estos hábitat acuáticos, algunos son ubicuos y al momento de estar en contacto con la piel pueden producir sensibilidad y/o infecciones.

En el caso de las levaduras los resultados encontrados por nosotros coinciden con Zapata, M & Vanegas M, quienes reportan el aislamiento de levaduras a partir de ambientes acuáticos, algunas

de ellas *Cándida spp.*, *Brettanomyces spp.* y *Hansenula spp.* En nuestro estudio no determinó el género de las levaduras obtenidas.

3.6 Morfología macroscópica de los clones aislados

La morfología macroscópica permite observar a simple vista el aspecto de las colonias, entre otras características: su tamaño, textura, olor, brillo, color, bordes, entre otras.

Tabla N° 5-3. Características de las bacterias aisladas del manantial termal del balneario “Termas La Merced”

N° Clon	MORFOLOGIA MACROSCOPICA (BACILOS GRAM NEGATIVOS)						
	Colonia	Borde	Elevación	Superficie	Consistencia	Color	Tamaño
2	Irregular	Ondulado	Elevada	Lisa	Cremosa	Crema-color hueso	3 mm
5	Irregular	Ondulado	Plana	Rugosa	Membranosa	Crema-color hueso	2,3 cm
6	Irregular	Entero	Plana	Rugosa	Membranosa	Amarillo	1,4 cm
12	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Cremosa	Crema-color hueso	6 mm
13	Irregular	Ondulado	Elevada	Lisa	Cremosa	Crema-color hueso	3 mm
16	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Cremosa	Crema-color hueso	8 mm
18	Circular	Ondulado	Elevada	Lisa	Cremosa	Crema-color hueso	3 mm
22	Circular	Entero	Plana	Lisa	Cremosa	Crema	5 mm
23	Irregular	Ondulado	Plana	Rugosa	Membranosa	Crema	1,2 cm
27	Irregular	Ondulado	Plana	Lisa	Cremosa	Crema	1,2 cm
28	Circular	Entero	Plana	Lisa	Cremosa	Crema	5 mm
31	Irregular	Ondulado	Plana	Rugosa	Membranosa	Crema	7 mm
N° Clon	MORFOLOGIA MACROSCOPICA (BACILO GRAM POSITIVO)						
	Colonia	Borde	Elevación	Superficie	Consistencia	Color	Tamaño
9	Circular	Ondulado	Elevada	Lisa	Cremosa	Crema-color hueso	6mm

Realizado por: NARANJO, C., 2015

En este estudio a partir de las muestras de agua, se obtuvo de la piscina del Balneario “Termas la Merced” un total de 21 clones bacterianos aislados, luego de realizar cinco repiques y reaislar los diversos clones bacterianos aislados, se lograron estabilizar y obtener en estado puro 20 clones bacterianos, posteriormente para la identificación se logró caracterizar e identificar a 13 clones

de 20, utilizando la tinción Gram se observó que 12 de los clones presentaron morfología de bacilos Gram negativos y un clon presento morfología de bacilo Gram positivo, las diferentes colonias obtenidas del manantial termal estudiado presentaron la mayoría un color crema y solo una colonia presento pigmentación de color amarillo. (Tabla N° 5-3 y Gráfico 4-3).

3.7 Número de clones puros aislados

La estimación del número de clones puros aislados de la piscina del Balneario “Termas La Merced”, se observa los resultados en la tabla N° 6-3

Tabla N° 6-3. Clones aislados en el manantial termal del balneario “Termas La Merced”

SITIO	NÚMERO DE BACTERIAS GRAM (+) AISLADAS	NÚMERO DE BACTERIAS GRAM (-) AISLADAS
Piscina	1	12
Pozo	0	0
TOTAL	1	12

Realizado por: NARANJO, C., 2015

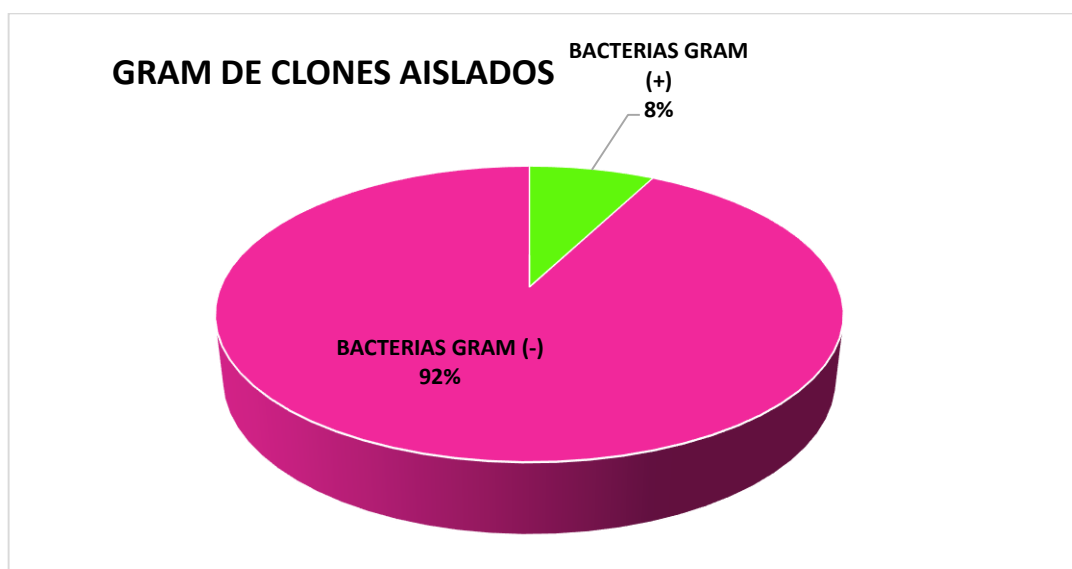


Gráfico 4-3 Número de clones aislados del manantial termal del balneario “Termas La Merced”

Realizado por: NARANJO, C., 2015

De los resultados obtenidos los clones aislados e identificados según la morfología bacteriana pertenecen en un alto porcentaje a bacterias Gram negativas, dando como resultado un mayor número en la Familia *Pseudomonaceae* (38,46%), seguido de la Familia *Enterobacteriaceae* (30,78%), la Familia *Aeromonadaceae* (15,38%) y finalmente la Familia *Moraxellaceae* (7,69%). Se encontró un representante de las bacterias Gram positivas que correspondió al género *Bacillus spp.* (7,69%).

En el caso de las bacterias Gram negativas y Gram positivas aisladas los resultados obtenidos son similares a lo reportado por Mosso, M. A; Sánchez, M. C; De la Rosa, Ma. Carmen; et al, quienes en un estudio de la microbiota del agua mineromedicinal de los Balnearios de Jaraba, aislaron 254 cepas bacterianas heterótrofas de las cuales 244 (96,1%) han sido identificadas, correspondiendo a bacilos Gram negativos 165 (65%), cocos Gram positivos 44 (17,3%) y bacilos Gram positivos 35 (13,8%). En todos los manantiales han predominado los bacilos Gram negativos; Mosso, Ma. Ángeles., et al en el 2007, en el Balneario Cervantes al igual que lo reportado por nosotros en el Balneario “Termas La Merced” existe un dominio de bacilos Gram negativos de especies fermentadoras (*Aeromonas*, *Budvicia aquatica*) y no fermentadoras (*Pseudomonas stutzeri*, *Acinetobacter*, *Brevundimonas*); De la Rosa, Ma. Carmen., et al. en el 2013, realizaron un estudio la microbiota de los manantiales mineromedicinales del Balneario Raposo y reportaron el aislamiento de 115 cepas de bacterias viables heterótrofas y oligotrofas, que corresponden a bacilos Gram negativos (73%), bacilos Gram positivos (23,5%) y cocos Gram positivos (3,5%). Al comparar los resultados obtenidos en los diferentes estudios de los Balnearios de España (Mosso, M. A; Sánchez, M. C; De la Rosa, Ma. Carmen), con lo encontrado por nosotros en este trabajo del Balneario “Termas La Merced”, indica que los resultados coinciden con los de nuestro estudio en que existe un predominio de bacilos Gram negativos. Lo que respecta a los géneros se asemejan con nuestro estudio géneros de la familia *Enterobacteriaceae* (Gram negativos) y *Bacillus* (Gram positivos) teniendo en cuenta que están ampliamente distribuidos en diferentes hábitats como son aire, suelo y agua., sin embargo difiere lo reportado en la oxidación y fermentación ya que en nuestro estudio las bacterias aisladas fueron inertes en casi su totalidad.

De la Rosa, M. C, en el 2002, realizaron estudios de la microbiota del agua mineromedicinal de los Balnearios de Alhama de Granada, reportando el aislamiento de bacilos Gram negativos en un 20,7% y bacilos Gram positivos en un 49,1%, este estudio predomino los géneros *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas* y *Stenotrophomonas*; sin embargo al comparar podemos observar que estos valores son diferentes a nuestro estudio ya que en el nuestro existe un predominio de bacilos Gram negativos más no de bacilos Gram positivos.

3.8 Resultados de las pruebas bioquímicas de los aislados puros

Las pruebas bioquímicas son un conjunto de reacciones mediante las cuales vamos a poder determinar de una manera clara y precisa la presencia o ausencia de una enzima, o la actividad de una vía metabólica a partir de un sustrato que se incorpora en un medio de cultivo.

La cepa Gram positiva que se logró aislar de las muestras de agua de la piscina, se llegó a identificar solo a nivel de género (Tabla N° 7-3). En cambio en el caso de los bacilos Gram negativos, todos se identificaron a nivel de género y especie gracias al uso de las pruebas bioquímicas. (Tabla N° 8-3).

Tabla N° 7-3. Pruebas Bioquímicas del clon aislado (Bacilo Gram positivo) del manantial termal del balneario “Termas La Merced”

ORIGEN	N° CLON	PRUEBAS							MEDIOS DE CULTIVO		
		Catalasa	Oxidasa	Hugh Leifson			Hidrólisis Almidón	Hidrólisis Gelatina	Motilidad	Crecimiento MacConkey	Fermentación Manitol
				O	F	I					
<i>Petrifilm E. coli/Coliformes</i>	9	+	+	-	-	-	+	-	+	-	

O: Oxidativo

F: Fermentativo

I: Inerte

Realizado por: NARANJO, C., 2015

Los resultados obtenidos en nuestro estudio, para el clon 9 aislado bacilo Gram positivo (tabla N° 7-3), catalasa positivo, movilidad positivo, oxidasa positivo, O/F de la glucosa fue inerte, hidrólisis del almidón fue positiva con la formación del halo, la temperatura óptima de crecimiento fue de 35°C, se evidenció crecimiento en Agar MacConkey y en Agar Manitol hubo crecimiento más no hubo fermentación da como resultado la identificación del clon bacteriano aislado con numeración 9 pertenece a la especie del género *Bacillus spp.*

En el 2008, Mosso, Ma, Ángeles., et al, en un estudio de la microbiota de los manantiales mineromedicinales del Balneario de Valdelateja, reportaron el aislamiento de especies del género *Bacillus spp.* Resultados similares fueron encontrados por De la Rosa, Ma. Carmen., et al, en el 2013, en un estudio de la microbiota del agua mineromedicinal del Balneario Raposo, donde

aislaron especies de *Bacillus spp.* Estos resultados coinciden con lo encontrado por nosotros, teniendo en cuenta que el género *Bacillus spp.* procede del suelo y es arrastrado por el agua, generalmente se encuentra en manantiales termales.

Tabla N° 8-3. Pruebas Bioquímicas de los clones aislados (Bacilos Gram negativos) del manantial termal del balneario “Termas La Merced”

ORIGEN	N° Clon	Pruebas										Medios de Cultivo		
		Catalasa	Oxidasa	Hugh Leifsonn			KLIGLER	CITRATO	UREASA	SIM			Crecimiento Macconkey	Crecimiento EMB
				O	F	I				Indol	M	H ₂ S		
Petrifilm <i>E. coli</i> /Coliformes	2	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+
	6	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+
	12	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+
	13	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+
	16	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+
	31	+	+	-	-	+	-/+	+	+	-	+	-	+	+
Agar Mueller Hinton	5	+	-	-	-	+	-/+	+	+	+	+	-	+	+
	18	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+
	22	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+
	23	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+
	27	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+
	28	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+

O: Oxidativo

F: Fermentativo

I: Inerte

M: Motilidad

Realizado por: NARANJO, C., 2015

En la tabla N° 8-3 se muestra las pruebas bioquímicas realizadas a los clones aislados observándose el predominio de bacilos Gram negativos, oxidasa variable, catalasa variable, móviles, O/F de la glucosa son fermentativos y oxidativos, en nuestras cepas la mayoría son inertes, temperatura de crecimiento en el estudio fue de 35°C, crecieron las bacterias en Agar MacConkey y en el Agar Eosina azul de Metileno. (MACFADDIN, Jean, 2003. pp. 604-605; 674- 681).

De igual forma se obtuvo clones 13,18 y 23 son bacilos Gram negativos, aerobios, catalasa positivo, oxidasa negativo, movilidad positivo, O/F de la glucosa oxidativo, en el estudio fueron inertes, la temperatura de crecimiento fue de 35°C, crecimiento en Agar MacConkey y en Agar Eosina azul de Metileno. (MACFADDIN, Jean, 2003. pp. 594 - 599).

3.9 Especies bacterianas identificadas

La identificación de los clones aislados se realizó por métodos basados en las características macroscópicas, microscópicas, pruebas bioquímicas, galerías Microgen.

En el gráfico N° 5-3, se observa los 13 clones aislados de bacterias viables heterótrofas y oligotrofas que corresponde su identificación según los tipos morfológicos a bacilos Gram negativos las especies de los géneros *Brevundimonas diminuta* (31%) siendo la más común con 4 aislados, *Citrobacter amalonaticus* (7%), *Aeromonas schubertii* (15%), *Budvicia aquatica* (15%), *Pseudomonas stutzeri* (8%) y *Acinetobacter haemolyticus* (8%) y *Xenorhabdus beddingii* (8%), y bacilos Gram positivos se logró identificar al género *Bacillus spp.* (8%)

Tabla N° 9-3. Clones aislados del manantial termal del balneario “Termas La Merced”

NÚMERO DE CLONES	PORCENTAJE DE COINCIDENCIA	GENERO Y ESPECIE	PORCENTAJE ESPECIES ENCONTRADAS EN EL BALNEARIO
4	100%	<i>Brevundimonas diminuta</i>	31 %
1	100%	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	7 %
1	71,43%	<i>Bacillus spp.</i>	8 %
2	92%	<i>Aeromonas schubertii</i>	15 %
2	84,6%	<i>Budvicia aquatica</i>	15 %
1	92%	<i>Xenorhabdus beddingii</i>	8 %
1	97,9%	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	8 %
1	97,1%	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	8 %

Realizado por: NARANJO, C., 2015

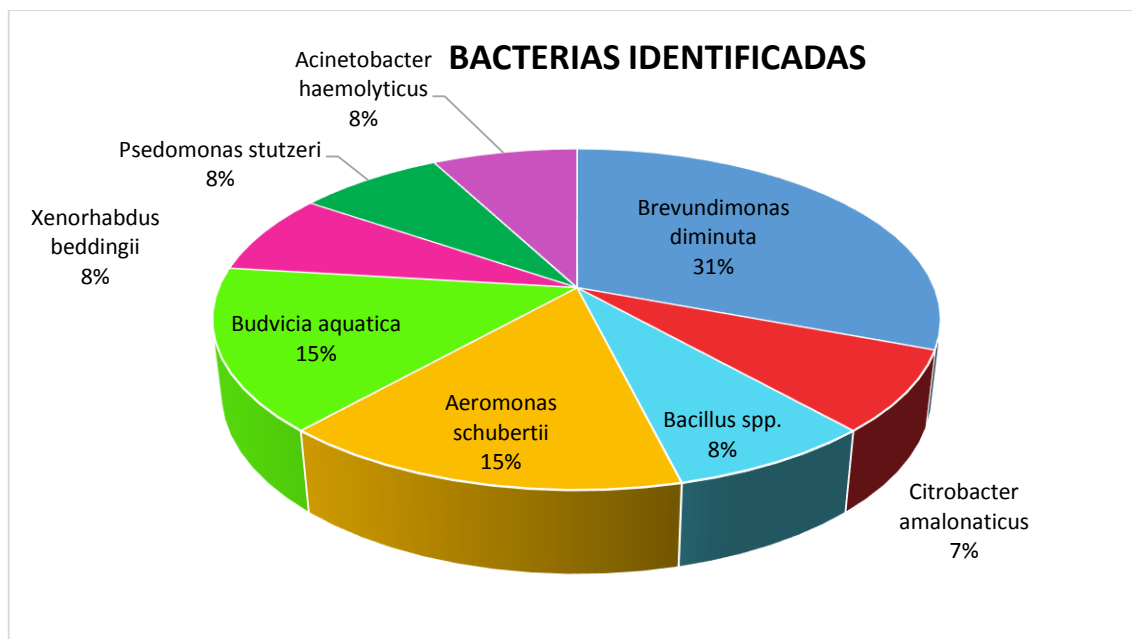


Gráfico 5-3 Identificación de Bacterias aisladas del manantial termal del balneario “Termas La Merced” ubicado en la parroquia La Merced.

Realizado por: NARANJO, C., 2015

Márquez (2007), en un estudio en el que aislaron bacterias del género *Bacillus*, estas fueron encontradas formando parte de la microbiota del suelo. Al comparar lo reportado en el estudio de Márquez con nuestro estudio podemos observar que el género *Bacillus* encontrado en la piscina pudo provenir del suelo y de la misma agua, ya que ese género se adapta y desarrolla con facilidad en diferentes hábitats; De La Rosa, Ma. Carmen., et al, en el 2013 reportaron el aislamiento de bacilos Gram positivos del género *Bacillus*, se encontraron en una proporción casi nula, presentaron pigmentación de color amarillo. En el caso de la especie *Bacillus* los resultados coinciden con lo reportado por De La Rosa, Ma. Carmen., et al en el 2013 y Márquez Francisco quienes indican que en los manantiales termales existe especies del género *Bacillus spp.*

En nuestro estudio del Balneario “Termas La Merced” se encontró la presencia *Budvicia aquatica*, una bacteria encontrada comúnmente en ríos, piscinas, etc., es un contaminante no asociado con heces o aguas residuales. Sin embargo no ha sido identificada como agente causante de enfermedades, en la industria se usan distintas cepas de *B. diminuta* para purificar desechos industriales. (KONEMAN, E., et al. 2008), esta especie también fue encontrada en aguas termales por Mosso, Ma, Ángeles., et al, en el 2008, en los manantiales mineromedicinales del Balneario de Valdelateja.

Acinetobacter haemolyticus es una fuente de infección en los hospitales para los pacientes debilitados. Capaz de sobrevivir en diversas superficies (tanto húmedas como secas) en el ámbito

hospitalario. Las infecciones más comunes por esta bacteria son infecciones urinarias, infecciones respiratorias e infecciones de la piel. (KONEMAN, E., et al. 2008). En nuestro caso encontramos esta bacteria, la cual suponemos debe provenir de las personas que usan la piscina.

En nuestro estudio se aisló una especie del género *Pseudomonas*, este resultado coincide con lo reportado por De la Rosa, Ma. Carmen., et al, en el 2004, en un estudio de la microbiota del agua mineromedicinal de los Balnearios de Jaraba, donde reportaron el aislamiento de esta especie *Pseudomonas stutzeri*, teniendo en cuenta que sobrevive con facilidad ya que no necesita de muchos nutrientes, proliferando en ambientes oligotróficos.

La *P. stutzeri* una bacteria reportada como desnitrificadora, se encuentra en suelo (humus), en agua estancada, resiste condiciones extremas de temperatura, está presente en una amplia variedad de hábitats. Algunas veces se ha asociado con infecciones como otitis, conjuntivitis, neumonía, meningitis. (KONEMAN, E., et al. 2008)

Otra de las especies aisladas en este trabajo es la *Aeromonas schubertii*, habitante de ecosistemas acuáticos la cual desempeña un papel importante como patógeno primario en el tracto gastrointestinal, las enfermedades asociadas a *Aeromonas schubertii* son enfermedades diarreicas y las infecciones de heridas que por lo general es cuando se ha expuesto la persona a agua contaminada. A pesar de que se han identificado algunos posibles factores de virulencia (por ejemplo: endotoxinas, hemolisinas, enterotoxinas, factores de adhesión), su papel exacto se desconoce. (KONEMAN, E., et al. 2008)

En nuestro estudio el clon más común que se aisló es la especie *Brevundimonas diminuta*, esta bacteria también fue aislada por Mosso, Ma, Ángeles., et al, en el 2011, en un estudio de la microbiota del agua mineromedicinal de los Balnearios de la Concepción de Villatoya,. En otros estudios realizados por Mosso, Maria, Ángeles [et al] en el 2008 y De la Rosa, Ma. Carmen., et al, en el 2013, también se reporta el aislamiento del género *Brevundimonas*, pero no de la misma especie aislada por nosotros.

Brevundimonas diminuta es un microorganismo ambiental con distribución mundial, aislado del agua, el suelo, las plantas y ocasionalmente de especímenes clínicos. En la industria se usan para purificar desechos industriales y disminuir. Es muy resistente a las fluoroquinolonas y se le ha relacionado con casos de bacteremia nosocomial.

El género, *Xenorhabdus*, se presenta en forma de bastón, es anaerobio facultativo, entomopatógenos. El hábitat normal de estas bacterias es el lumen intestinal de nematodos o la cavidad del cuerpo de los insectos. Este género pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* ya que las bacterias de este género presentan características de la familia *Enterobacteriaceae*. El género

Xenorhabdus se diferencia de otros géneros de enterobacterias por la reducción de los nitratos a nitritos, asociación íntima con nematodos entomógenos. (KONEMAN, E., et al. 2008)

3.10 Susceptibilidad a los antibióticos

El antibiograma permite determinar la efectividad de los antibióticos contra los microorganismos, este constituye una herramienta muy importante.

La evaluación del efecto de los antibióticos (Trimetoprim/sulfametoxazol: STX, Imipenem: IPM, Amoxicilina/Ac. clavulánico: AMC, Ceftriaxona: CRO, Gentamicina: CN, Cefalotina: KF, Ampicilina: AM, Ciprofloxacino: CIP, Eritromicina: E, Oxacilina: OX y Penicilina: P) sobre los clones aislados muestra resultados muy variados (tabla N° 10-3 y tabla N° 11-3), llegándose a obtener clones resistentes hasta a tres antibióticos diferentes (clon 2 y clon 12) mientras que tres clones (clon 13, clon 27 y clon 28) fueron sensibles a todos los antibióticos utilizados. Es importante hacer notar que los antibióticos STX, CN, CRO Y CIP mostraron actividad inhibitoria sobre todos los clones evaluados, mientras que el KF solo mostro actividad inhibitoria sobre 3 clones de los 12 clones aislados.

Tabla N° 10-3. Antibiograma de Bacilos Gram negativos del manantial termal del balneario “Termas La Merced”

N° Clon	Nombre	ANTIBIOTICOS							
		AMC 30	IPM 10	STX 25	CN 10	CRO 30	KF 30	AM 10	CIP 5
Clon 2	<i>Brevundimonas diminuta</i>	R	S	S	S	S	R	R	S
Clon 5	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	S	S	S	S	S	R	S	ND
Clon 6	<i>Brevundimonas diminuta</i>	R	ND	S	S	S	R	S	S
Clon 12	<i>Brevundimonas diminuta</i>	R	S	S	S	S	R	R	S
Clon 13	<i>Aeromonas schubertii</i>	S	ND	S	S	S	S	S	S
Clon 16	<i>Aeromonas schubertii</i>	S	S	S	S	S	R	R	ND
Clon 18	<i>Budvicia aquatica</i>	S	S	S	S	S	R	S	S
Clon 22	<i>Xenorhabdus beddingii</i>	S	S	S	S	S	R	S	ND
Clon 23	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	S	S	S	S	S	R	S	ND
Clon 27	<i>Budvicia aquatica</i>	S	ND	S	S	S	S	S	S
Clon 28	<i>Brevundimonas diminuta</i>	S	ND	S	S	S	S	S	S
Clon 31	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	S	S	S	S	S	R	S	S
Resistente: R		Sensible: S			No tiene disco: ND				
Ciprofloxacino 5µg: CIP 5		Ampicilina 10µg: AM 10							
Cefalotina 30µg: KF 30		Ceftriaxona 30µg: CRO 30							
Gentamicina 10µg: CN 10		Imipenem 10µg: IPM 10							
Amoxicilina/Ac.clavulanico 20/10µg: AMC 30									
Trimetoprim/sulfametoxazol 1,25/23,75mcg: STX 25									

Realizado por: NARANJO, C., 2015

Los antibióticos no causan por sí mismos resistencia. Algunas bacterias pueden obtener resistencia de otras especies en un fenómeno conocido como transferencia horizontal de genes por conjugación. (MIRZAEI, Bahman., et al, 2014). La resistencia a los antibióticos en bacterias es una característica que puede estar codificada en el cromosoma o en una secuencia de ADN cromosomal (plásmido). (MARTÍN, 2009).

Rosenberg y col. en 1989, investigaron 87 marcas de aguas minerales teniendo como objeto el determinar la presencia de bacterias heterótrofas, específicamente del género *Pseudomonas* resistentes a antibióticos, como resultado obtuvieron 81 cepas, determinaron la presencia de *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens*, entre otras. Estas especies fueron resistentes a antibióticos como el Cloranfenicol, Ampicilina, Gentamicina y Tetraciclina; En el 2005, Messi y col. aislaron 120 cepas de aguas minerales, las especies predominantes fueron *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas aeruginosa* y con baja frecuencia de *Burkholderia cepacia*, las cuales presentaron resistencia a Ampicilina, Gentamicina, Amikacina y ácido Nalidíxico.

Vay, C.A., et al. (2005) en un estudio acerca de la Actividad "in vitro" de diferentes antibacterianos sobre bacilos gram-negativos no fermentadores determinaron concentraciones inhibitorias mínimas frente a los siguientes antibióticos: ampicilina, piperacilina, piperacilina-tazobactama, sulbactama, cefoperazona, cefoperazona-sulbactama, ceftazidima, cefepima, aztreonam, imipenem, meropenem, colistina, gentamicina, amikacina, trimetoprim-sulfametoxazol, cloranfenicol, eritromicina, rifampicina, norfloxacin, ciprofloxacina y minociclina, reportando que *Pseudomonas stutzeri* fue sensible a los antibacterianos ensayados. Al cotejar con nuestros resultados son similares en el caso de sensibilidad de imipenem, trimetoprim/sulfametoxazol, gentamicina y ciprofloxacina, sin embargo la mayoría de antibióticos usados en el estudio de Vay, C.A., et al., no fueron usados en nuestro estudio.

En el estudio de Navarro se puede observar que la especie *Citrobacter amalonaticus* es resistente a la ticarcilina y a la ampicilina, al comparar los resultados con los nuestros la cepa de nuestro estudio no presenta resistencia a la ampicilina, presenta resistencia a la cefalotina esto puede deberse a una resistencia adquirida (cambios genéticos) o intrínseca. (NAVARRO, F., et al, 2010)

Al comparar los resultados obtenidos para las cepas aisladas del Balneario "Termas La Merced", con los diferentes estudios reportados en la literatura; se puede observar una variabilidad de los comportamientos de las diferentes especies identificadas, respecto a la resistencia frente a los antibióticos que comúnmente son utilizados por las casas de salud. Por lo que es difícil establecer una relación ambiente-resistencia antibiótica de los aislados de aguas termales, ya que el ambiente en sí, podría influenciar sobre la variabilidad genética de las bacterias, induciendo diferentes mecanismos de resistencia.

Lösch, L., Merino, L. & Alonso, J, en el 2006, realizaron un estudio de perfil de susceptibilidad antibiótica en especies de la Familia *Enterobacteriaceae*, las cuales mostraron resistencia a los antibióticos ampicilina, ampicilina-sulbactama, cefalotina, ampicilina y amoxicilina

Salazar, E. & Nieves, B., en el 2005, reportaron que durante los últimos 20 años se ha observado un aumento de resistencia antimicrobiana de manera que las infecciones producidas por microorganismos resultan difíciles de tratar. Antes se podían tratar con antibióticos como aminopenicilinas, cefalosporinas, cloranfenicol y tetraciclina. Los antibióticos que se usan en la actualidad son imipenem, tobramicina y fluoroquinolonas. Cada vez es más frecuente encontrar resistencia combinada a todos los b-lactámicos, aminoglucósidos y quinolonas. Los mecanismos de resistencia a antibióticos b-lactámicos en especies de *Acinetobacter*, incluyen producción de b-lactamasas, modificación de la proteína de unión a la penicilina, y permeabilidad reducida de la membrana. La producción de b-lactamasas, tanto plasmídicas como cromosómicas es el mecanismo más estudiado. El principal mecanismo de resistencia a los aminoglucósidos es la producción de enzimas inactivantes, la aminoglucósido-3'- fosfotransferasa VI, que inactiva a la amikacina.

Tabla N° 11-3. Antibiograma de Bacilo Gram positivo del manantial termal del balneario “Termas La Merced”

N° Clon	Nombre	ANTIBIOTICOS						
		CN 10	KF 30	AM 10	P 10	E 15	OX 1	CIP 5
Clon 9	<i>Bacillus spp.</i>	S	R	S	R	S	R	S
Resistente: R	Sensible: S	No tiene disco: ND						
Ciprofloxacino 5µg: CIP 5		Oxacilina 1µg: OX 1						
Eritromicina 15µg: E 15		Penicilina 10 U: P 10						
Ampicilina 10µg: AM 10		Cefalotina 30µg: KF 30						
Gentamicina 10µg: CN 10								
Realizado por: NARANJO, C. 2015								

En la tabla 11-3 se observa los resultados de susceptibilidad a los antibióticos que presento el bacilo Gram positivo, observándose resistencia a la oxacilina, penicilina y a la cefalotina y los antibióticos que inhibieron el crecimiento fueron el ciprofloxacino, eritromicina, ampicilina y la gentamicina.

En el 2001, FARÍA, José., et al, en un estudio acerca de resistencia a los antimicrobianos de especies de *Bacillus* aislados de la leche cruda, reporto como resultado que algunas cepas de

Bacillus fueron resistentes a la penicilina, oxacilina y amoxicilina/ácido clavulánico y los antibióticos que inhibieron el crecimiento fueron los aminoglucosidos, fluoroquinolonas, eritromicina. Al cotejar con los resultados de nuestro estudio son similares en la resistencia ya que presentan una resistencia a los antibióticos como la oxacilina, penicilina por lo contrario en el patrón de sensibilidad se asemejan presentando un efecto inhibitorio en los antibióticos gentamicina, eritromicina y ciprofloxacino.

3.11 Resultados Presencia de metalo-β-lactamasa

En el estudio la presencia de esta enzima nos va indicar que hidroliza una gran variedad de antibióticos β-lactámicos, incluyendo penicilinas, cefalosporinas (1^a, 2^a, 3^a y 4^a generación) y carbapenemes. Mediante la detección de esta enzima se puede dirigir un tratamiento óptimo de antibióticos.

Tabla N° 12-3. Resultados de la prueba antibiograma con EDTA sobre las bacterias del manantial termal del balneario “Termas La Merced”

N° CLON	NOMBRE	PRUEBA DE DISCO CON EDTA (0,5 M)
Clon 2	<i>Brevundimonas diminuta</i>	Negativo
Clon 5	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	Negativo
Clon 12	<i>Brevundimonas diminuta</i>	Negativo
Clon 18	<i>Aeromonas schubertii</i>	Negativo
Clon 16	<i>Budvicia aquatica</i>	Negativo
Clon 22	<i>Xenorhabdus beddingii</i>	Negativo
Clon 23	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	Negativo
Clon 31	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Negativo

Ácido etilendiaminotetraacético: EDTA

Realizado por: NARANJO, C., 2015

La producción de metalo-β-lactamasas (MBLs) es uno de los mecanismos principales de resistencia carbapenem entre aerobios Gram-negativas. Las cuales necesitan átomos de zinc, es utilizado como metal cofactor para su actividad enzimática. Las enzimas MBLs, se encuentran dentro de integrones, se asocian con plásmidos y transposones haciendo más fácil la transferencia de esta resistencia entre bacterias. (QUEENAN, A & BUSH, K, 2007).

Todos los clones sobre las que se realizó la prueba de la presencia de la *metalo-β-lactamasas* (MBLs) mostraron resultado negativos, lo que indica que no son productoras de *metalo-β-lactamasas*. (Tabla N° 12-3)

3.12 Resultados de la actividad antibacteriana

Las cepas aisladas e identificadas fueron evaluadas por el método de difusión en agar para determinar el potencial antibacteriano contra dos cepas ATCC.

Tabla N° 13-3. Actividad antibacteriana de clones aislados e identificados procedentes del manantial termal del balneario “Termas La Merced”

N° CLON	CEPAS	HALOS (mm)	
		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
2	<i>Brevundimonas diminuta</i>	-	-
5	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	-	-
6	<i>Brevundimonas diminuta</i>	3mm	-
9	<i>Bacillus spp.</i>	4mm	4mm
12	<i>Brevundimonas diminuta</i>	-	-
13	<i>Aeromonas schubertii</i>	-	-
18	<i>Aeromonas schubertii</i>	-	-
16	<i>Budvicia aquatica</i>	5mm	5mm
22	<i>Xenorhabdus beddingii</i>	-	-
23	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	-	-
27	<i>Budvicia aquatica</i>	-	-
28	<i>Brevundimonas diminuta</i>	-	-
31	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	-	-

Realizado por: NARANJO, C., 2015

La evaluación de la producción de sustancias con actividad antibacteriana realizada a los 13 clones aislados mostró resultados positivos en las cepas *Budvicia aquatica* y *Bacillus spp.*, en las que se observó el efecto inhibitorio sobre la bacteria Gram negativa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, similares efectos fueron generados por los aislados *Brevundimonas diminuta*, *Budvicia aquatica* y *Bacillus spp.* sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. (Tabla N° 13-3).

CONCLUSIONES

En este estudio microbiológico se aislaron 21 cepas bacterianas, de las cuales 13 cepas (61.90%) fueron aisladas e identificadas, de ellas corresponden a bacilos Gram negativos 12 cepas (92,30%) y bacilos Gram positivos 1 cepa (7,7%).

Las especies bacterianas Gram negativas identificadas, fueron *Brevundimonas diminuta*, *Citrobacter amalonaticus*, *Aeromonas schubertii*, *Budvicia aquatica*, *Acinetobacter haemolyticus*, *Pseudomonas stutzeri* y *Xenorhabdus beddingii*. Y solo una especie del género *Bacillus* presento características de Gram positiva.

En la muestra que se tomó del pozo en el Balneario “Termas La Merced” no se encontró la presencia de algún tipo de microorganismo.

En cuanto a la calidad sanitaria, en el pozo, al regimos a la Legislación Española (BOE número 226 del 20 de septiembre de 1990) relativa a la reglamentación técnico sanitaria para el abastecimiento y control de calidad de las aguas potables de consumo público, podemos decir que el agua del pozo del Balneario cumple con la Legislación y es apta para los bañista.

En cuanto a la susceptibilidad de los antibióticos en el presente estudio se obtuvieron clones resistentes hasta 3 antibióticos en el caso de la especie *Brevundimonas diminuta*, mientras que las especies *Aeromonas schubertii* y *Budvicia aquatica* fueron sensibles a todos los antibióticos utilizados en el estudio.

Los 13 clones aislados e identificados fueron sensibles a los antibióticos STX, CN, CRO y CIP, mientras que la KF fue el antibiótico frente al cual mayor cantidad de clones (10) mostraron resistencia.

RECOMENDACIONES

Las aguas mineromedicinales son empleadas en los balnearios para tratamientos terapéuticos, recreación, etc. por lo que es necesario que se realice constantemente un control microbiológico, para de esta manera poder evitar cualquier riesgo sanitario asociado a la presencia de microorganismos patógenos, que puedan transmitirse.

Cada cierto tiempo dar mantenimiento o cambio a las tuberías o canales por donde va el agua del pozo a la piscina, para evitar la formación de biofilms ya que estos son posibles contaminantes externos capaces de producir daños en la salud de los usuarios del Balneario. El material del cual están fabricados las piscinas debe ser de una superficie lisa, fácil limpieza y desinfección para de esta manera lograr que los trabajadores realicen una adecuada y óptima limpieza.

Los trabajadores del Balneario “Termas La Merced” deben ser revisados periódicamente por un equipo de salud, para de esta manera prevenir y detectar posibles enfermedades que se pueden transmitir al estar en contacto con el agua de la piscina. Para la seguridad de los bañistas y de los trabajadores, al momento de realizar la limpieza y desinfección, estos deben portar un equipo de protección para evitar alguna posible contaminación por parte del personal del Balneario.

Implementar un pediluvio, mediante el cual se de una desinfección de los pies ya que estos pudieren ser portadores de bacterias al momento de estar en contacto con el agua, estos se deben ubicar en cada esquina de la piscina y ser utilizados antes de ingresar a la misma.

Es necesario continuar con los estudios de la actividad antibacteriana con las especies *Brevundimonas diminuta*, *Budvicia aquatica* y *Bacillus spp.* para de esta manera ver si estas especies presentan beneficios a nivel industrial.

BIBLIOGRAFIA

3M España S.A. (2009). *Petriefilm. Guía de interpretación: 1-80*.

ABALNEARIOS. (1999). *El agua* [en línea]. España. [Consulta: 2014-10-23]. Disponible en: <http://www.abalnearios.com/elagua/>.

ÁLVAREZ, M; et al. *Manual de técnicas en microbiología clínica*. 2da. Ed. España. 1990, pp. 23-79.

APELLA, MA. & ARAUJO, P. *Microbiología de agua. Conceptos básicos*. [en línea]. España [Consulta: 2015-03-12]. Disponible en: <http://catedras.quimica.unlp.edu.ar/ingenieriabioquimicalyII/microbiologia.pdf>

AQUIAHUATL, Ma. et al. *Manual de prácticas de laboratorio. Microbiología general*. 1^{ra}. Ed. México. 2012. pp. 11-29.

ARGUELLO, G. *Aguas termales, origen, clasificación y composición*. Inglaterra. Locos por la Geología. 2010. [Consulta: 2014-10-23]. Disponible en: <http://www.locosporlageologia.com.ar/aguas-termales-origen-clasificacion-ycomposicion/>

ARIAS, F. *Manual de técnicas analíticas para la determinación de parámetros fisicoquímicos y contaminantes marinos (aguas, sedimentos y organismos)*. Santa Marta, Colombia. 2003. pp. 21-24.

ARMIJO, M & SAN MARTIN, J. *Clasificación de las aguas mineromedicinales. En: Curas balnearias y climáticas. Talasoterapia y Helioterapira*. 2^a Ed. Madrid.España. 1994. pp. 219-223

ARMIJO, M. (1994), *Bases biológicas de la acción de las curas balnearias*. 3^{ra} Ed. Madrid. España. pp. 161-176.

ARMIJO, M.; BACAIOCA, J. *Curas balnearias y climáticas*. 4^{ta} Ed. Madrid. España. 1994. pp. 143-155.

AZNAR, A. “Determinación de los parámetros físico-químicos de la calidad de las agua”. *Gestión ambiental*. Vol. 2 (23). (2000). pp. 3-4; 7-8.

BASHIR, Mohammad; et al., *Antibiotic susceptibility profile of Aeromonas spp. isolates from food in Abu Dhabi, United Arab Emirates.*, 2009, pp. 17-23

CAMACHO, A; et al. *Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos*. 2ª ed. México. 2009. pp. 34-36

CASTANY, G. *Aguas Termo minerales*. España. Editorial Omega. 1984. pp. 636-637.

CERCENADO, Emilia & SAAVEDRA, Jesús. *El antibiograma. Interpretación del antibiograma: conceptos generales*. [en línea]. Madrid. España. 2009. [Consulta: 2015-05-08].

Disponible en:

http://apps.elsevier.es/watermark/ctl_servlet?_f=10&pidet_articulo=80000504&pidet_usuario=0&pcontactid=&pidet_revista=51&ty=35&accion=L&origen=apcontinuada&web=www.apcontinuada.com&lan=es&fichero=v7n4a404pdf001.pdf

CERÓN, J. C; et al. “Geoquímica de las aguas termales con CO₂ de las Cordilleras Béticas”. *Estudios Geológicos*. Vol. 54. (1998). pp. 199-207.

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. (2007), (Estados Unidos). pp. 1124-1125

CARVALH, Ana; et al., “IMP-16 in Pseudomonas putida and Pseudomonas stutzeri: potential reservoirs of multidrug resistance”. *Journal of Medical Microbiology*. [en línea], 2009, (San Francisco-USA) Vol. (73). [Consulta: 2015-05-12]. ISSN 0.020487-0. Disponible en:

<http://jmm.sgmjournals.org/content/59/9/1130.full>

DE LA ROSA, M. & MOSSO, M. “Diversidad microbiana de las aguas minerales termales”. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, (2000). (Madrid-España). pp. 153-158

DE LA ROSA, M. & MOSSO, M. “Historia de las aguas mineromedicinales en España”. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, (2004). (Madrid-España). pp. 117-137.

DE LA ROSA, M., SÁNCHEZ, M., RODRÍGUEZ, C., MOSSO, M. “Microbiología del manantial termal del Balneario Puente Viesgo”. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, (2007). pp. 73:251-265.

ESLAVA, Camilo; et al., “Celulitis facial odontogénica severa infrecuente causada por *Citrobacter freundii* productora de AMPC en un paciente con Diabetes Mellitus 2”. *Revista Med*, Vol. 20, núm. 1. (2012), (Bogotá-Colombia). pp. 35-41

FAGUNDO, J & GONZALES, P. (1996). *Aguas naturales, minerales y mineromedicinales*. [en línea]. España. 1996. [Consulta: 2014-10-17]. Disponible en:
<http://www.invenmar.org.co/redcostera1/invenmar/docs/7010manualTecnicasanaliticas.Pdf>

FAGUNDO, J; et al. (1999), *Revisión bibliográfica sobre clasificación de las aguas minerales y mineromedicinales*. Centro Nacional de Termalismo “Victor Santamarina”. [en línea]. España. 1999. [Consulta: 2015-02-23]. Disponible en:
http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/rehabilitacionbal/clasificacion_aguas_minerales.pdf.

FARMACIAMERITXELL. (2013). *Aguas Termales* [blog]. El blog de Meritxell, 2013. [Consulta: 2014-10-23]- Disponible en:
<http://blog.hola.com/farmaciameritxell/2013/08/aguas-termales.html>.

FARÍA, José; et al. “Resistencia a los antimicrobianos de especies de *Bacillus* aisladas de leche cruda”. *Revista Científica, FCV-LUZ*, Vol. 6, (2001), (Maracaibo-Venezuela). pp. 479-484.

FERNÁNDEZ, A; et al. (2006). “Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología” [en línea], 2006, (México). pp. 3-25. [Consulta: 2015-03-12]. Número ISSN 978-84-614-7932-0. Disponible en:
<https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf>

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

FORBER, B., SAHNS, D., & WEISSFELD, A. (2004). *Diagnóstico microbiológico* [en línea]. Buenos Aires, Argentina. 11 ed. [Consulta: 2014-10-23]. Disponible en:
https://books.google.com.ec/books?id=239cauKqSt0C&pg=PR4&lpg=PR4&dq=forbes,+sahm++diagnostico+microbiologico&source=bl&ots=2PdEee8HKe&sig=FQZICgKDG94iBKlo8C9U3zT0fII&hl=es&sa=X&ei=N7IuVY6fL_O1sQTihoCwBA&ved=0CDMQ6AEwAw#v=onepage&q=forbes%2C%20sahm%20%20diagnostico%20microbiologico&f=false

GOLDSCHIEDER N. *Microbial biocenosis in pristine aquifers and an assesment of investigative methods*. Estados Unidos, 2006, pp. 926-941.

GUEVARA, A. *Control de calidad del agua. Métodos de análisis para la evaluación de la calidad del agua*. Lima-Perú, 1996, pp. 10-11.

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGÍA E HIDROLOGÍA. *Aguas termominerales del Ecuador* [en línea]. Ecuador. 2013. [Consulta 2014-11-13]. Disponible en:
<http://issuu.com/inamhi/docs/termalismo>

JAWETZ, E; et al. *Microorganismos entéricos Gram negativos*. 11 ed. Cali-Colombia: El manual moderno S.A, 2005, pp.89-98

KONEMAN, E; et al. *Diagnóstico microbiológico: texto y atlas color*, 6^ª. Ed. Madrid-España, Médica panamericana, 2008. pp. 955-1030.

LA MERCED GOBIERNO PARROQUIAL. Información general [en línea]. Quito-Ecuador, 2009-2014. [Consulta: 2014-10-23]. Disponible en:
<http://www.lamerced.gob.ec/web/index.php/la-parroquia/informacion-general>.

LARRAIZA, L. (2014). *Clasificación de las aguas termales* [en línea]. Madrid-España. 2014. [Consulta: 2014-10-23]. Disponible en:
<http://www.leirelarraiza.com/operativa/clasificacion-de-las-aguas-termales/>

LECHEVALIER, M. BABCOCK, T. y LEE, R. “Examination and characterization of distribution the biofilms”. *Appl. Environ. Microbiol*, Vol 5, (1987), (Estados Unidos) pp. 2714-2724.

MACFADDIN, J. (2003). *Pruebas bioquímicas para la Identificación de bacterias de importancia clínica*. 3ª edición. Buenos Aires-Argentina: 2003, pp. 470, 595-632, 676-682

MARAVÉ, F; et al. *Vademécum de aguas mineromedicinales españolas*. Madrid-España: Editorial San Carlos, 2003, pp. 13-14; 16.

MÁRQUEZ, Francisco., *Aislamiento y taxonomía de bacterias del género bacillus recolectadas en suelos de un bosque de pinus radiata y una pradera permanente en distintas épocas de muestreo.*, (Tesis pregrado), Licenciado en Ciencias Biológicas. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias. Escuela de Ciencias., Valdivia-Chile., 2007., pp. 4-5.

MARTIN, M; et al. “Análisis microbiológico y fisicoquímico del agua de piscinas de la Isla de Tenerife”. *Revista de Salud pública*, No. 5, (1992), (España) pp. 281-289

MEDICA-TEC. *Identificación de MicrogenTM GN-ID* [en línea]. Camberley-Reino Unido. 2004. [Consulta: 2015-03-10]. Disponible en:

<http://www.medica-tec.com/chi/files/MICROGEN-GN-ID-MID64-641-65..pdf>

MÉNDEZ, A. (2014). *Aguas Termales* [blog]. España, Blog. Ciencias-Médicas, 2014. [Consulta: 2014-10-23]. Disponible en:

<http://blog.ciencias-medicas.com/archives/853>

MIRZAEI, Bahman; et al., “First report of isolation and identification of Brevundimonas (pseudomonas) diminuta from collected nasopharyngeal specimens in suspected patients to pertussis”. *African Journal of Microbiology Research*, vol. 8, (2013), (África), pp. 1202-1207.

MONTERO, José. “Tratamiento antibiótico de las infecciones graves por Acinetobacter spp”. *Revista Electrónica de Medicina Intensiva*. [en línea], 2004, (Sevilla-España) Vol 4, pp. 45-67. [Consulta: 2015-05-13]. Disponible en:

<http://remi.uninet.edu/2004/06/REMIC04i.htm>

MORA, D. (1996), “Criterios microbiológicos para evaluar la calidad del agua en sus diferentes usos”. *Revista Costarricense de Salud Pública*, Vol. 5, Numero 9. (1996), (Costa Rica) pp. 23-33.

MOSSO, M; et al. “Microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario Cervantes”. *Anales de la real academia nacional de farmacia*. Vol. 72, (2006), (España) pp. 285-304.

MOSSO, M.A. & DE LA ROSA, M.C. “Microbiología de los manantiales minero medicinales del Balneario de Baños de la Concepción”. *Anales de la real academia nacional de farmacia*, Vol 77, (2011), (España) pp. 57-73.

NAVARRO, Ferran MIRÓ, Elisenda & MIRELIS, Beatriz., *Lectura interpretada del antibiograma de enterobacterias* en línea]. Barcelona-España., 2010. [Consulta: 2015-04-24].

Disponible en:

<http://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-lectura-interpretada-del-antibiograma-enterobacterias-13184029>

NORMA CUBANA DE AGUA MINERAL.(1995). N.C. 93-01-218, La Habana-Cuba., pp 8.

http://apps.elsevier.es/watermark/ctl_servlet?_f=10&pident_articulo=80000504&pident_usuario=0&pcontactid=&pident_revista=51&ty=35&accion=L&origen=apcontinuada&web=www.apcontinuada.com&lan=es&fichero=v7n4a404pdf001.pdf
2015-05-08

ISO 7954. *Procedimiento recuento mohos y levaduras en alimentos*

NTE INEN 2169:98. *Agua. Calidad del agua. Muestreo. Manejo y conservación de muestras.*

NTE INEN 2176:2013. *Agua. Calidad del agua. Muestreo. Técnicas de muestreo.*

NUÑEZ, C. *Libro de Ciencias Microbiología.* España: 1996, pp. 45-69

OVERMAN, Timothy & JANDA, Michael., “Antimicrobial Susceptibility Patterns of *Aeromonas jandaei*, *A. schubertii*, *A. trota*, and *A. veronii* Biotype *veronii*”. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 37 (1999), (USA) pp. 706-708.

PASCUAL, M. *Microbiología alimentaria. Metodología analítica y bebidas.* 2da Edición, Madrid-España. 2000, pp. 356-367.

PISABARRO, A. (2008). *Microbiología clínica* [en línea]. España. [Consulta: 2015-03-12]. Disponible en:

[http://www.cff.org.br/userfiles/file/Pasta%20-%20Costa%20Rica/_XVI%20Congreso%20Farmac%C3%A9utico%20Nacional%20\(PDF\)___/Clase%201%20M%C3%A9todos%20fisicoqu%C3%ADmicos%20y%20microbiol%C3%B3gicos%20para%20garantizar%20la%20calidad%20de%20agua.pdf](http://www.cff.org.br/userfiles/file/Pasta%20-%20Costa%20Rica/_XVI%20Congreso%20Farmac%C3%A9utico%20Nacional%20(PDF)___/Clase%201%20M%C3%A9todos%20fisicoqu%C3%ADmicos%20y%20microbiol%C3%B3gicos%20para%20garantizar%20la%20calidad%20de%20agua.pdf)

QUEENAN, A. M. & BUSH, K. *Carbapenemases: the versatile β -lactamases*. *Clin Microbiol.* Estados Unidos, 2007, pp.440–458.

ROCHA, Rosa, LOZANO Patricia & MARTÍNEZ Ygnacio., *Mecanismos de Patogenicidad e Interacción: Parásito-Hospedero II*, Puebla-México, 2006, pp. 239

RHEINHEIMER, G. *Microbiología de las aguas*. Zaragoza. España: Editorial. Acribia, 1987, pp. 233-239.

RÍSQUEZ, G; et al. *Metodología de la investigación*. México, 1999, pp. 39-41.

RODÉS, O. (2000). *Control de calidad de las aguas minero-medicinales*. Madrid-España: Editorial Panorama actual de las Aguas Minerales y Minero-medicinales en España, pp. 75-84

RODRÍGUEZ, E. (2005). *Bacteriología General: Principios y Prácticas de Laboratorio*. [en línea]. Costa Rica. [Consulta: 2015-04-07]. Disponible en:

http://books.google.com.ec/books?id=vwB0fgirgN0C&pg=PA3&hl=es&source=gbs_toc_r&cad=3#v=onepage&q&f=false

RODRÍGUEZ, José; et al., “Characterization of fluoroquinolone resistance in a clinical isolate of *Pseudomonas stutzeri*”. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Vol. 10, (2009), (Estados Unidos) pp. 34-56

SALAZAR, Elsa & NIEVES, Beatriz., *Acinetobacter spp.: Aspectos microbiológicos, clínicos y epidemiológicos*. [en línea]. Mérida-Venezuela., 2005. [Consulta: 2015-05-13]. Disponible en: <http://medicina.ufm.edu/images/e/e6/Acinetobacter.pdf>

SALUD.KIOSKEA.NET. *Antibiograma*. [en línea]. Canada, 2015. [Consulta: 2015-05-08]. Disponible en:

<http://salud.kioskea.net/faq/5924-antibiograma>

SANTAMBROSIO, E. (2009). *Tinción y observación de microorganismos*. [en línea]. Venezuela, 2009. [Consulta: 2015-04-07]. Disponible en:
http://www.firro.utn.edu.ar/repositorio/catedras/quimica/5_anio/biotecnologia/practico4.pdf

SUÁREZ, M. *Estudio de las propiedades químico físicas y terapéuticas de algunas aguas mineromedicinales*. Cuba, 1998, pp. 72

TAIWAN, LEE, M.R; et al., *Bacteremia caused by Brevundimonas species at a tertiary care hospital in Taiwan* [en línea]. Taiwan, 2000. [Consulta: 2015-04-23]. Disponible en:
<http://link.springer.com/article/10.1007/s10096-011-1210-5#page-1>

TATTAWASART, Unchalee; et al. “Comparative responses of *Pseudomonas stutzeri* and *Pseudomonas aeruginosa* to antibacterial agents”. *Journal of Applied Microbiology*, Vol 87, (1999), (Estados Unidos) pp. 323–331

TERMAS DE LA MERCED. *Localización* [en línea]. Quito-Ecuador, 2010. [Consulta: 2014-10-23]. Disponible en: <http://termasdelamerced.com/#>.

TORRELLA F, *La sulfuraria de Baños de Montemayor (Cáceres): características morfológicas y funcionales de la comunidad microbiana constituyente*. Murcia – España, 2006, 234-242.

VALERA, R; et al. *Antibiograma* [en línea]. España. 2010. [Consulta: 2015/05/08]. Disponible en:
<https://sites.google.com/a/goumh.umh.es/practicas-de-microbiologia/indice/estudio-de-la-sensibilidad-a-antimicrobianos/antibiograma>

WORDPRESS. *Enfermedades transmitidas por los alimentos*. [en línea] México, 2010. [Consulta: 2015-01-14]. Disponible en:
<https://avdiaz.files.wordpress.com/2010/02/encuentro-3.pdf>

YEE-GUARDINO, S; et al. *Nosocomially acquired Pseudomonas stutzeri brain abscess in a child: case report and review*. *Infect Control Hosp Epidemiol*. [en línea]. Estados Unidos, 2006. [Consulta: 2015-01-14]. Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16755486>

ANEXOS

ANEXO A: Ficha de clasificación del Balneario “Termas La Merced”

Cuenca:	Esmeraldas	H. Topgraf.	Sangolquí	Localidad:	La Merced
Provincia	Pichincha	ESTE (UTM)	790011	Propietario:	
N° :	97	NORTE (UTM)	9967713	Fecha:	30/11/2012
Tipo:	Vert. Termal	Elevación	2595	Uso:	Recreacional
		Proyección:	WGS84	Zona	17 S

BALANCE IONICO

ANION	mg/l	CATION	mg/l	OTRAS DETERMINACIONES	
CO3H-	560,20	Na+	64,85	Parámetros	
CO3=	0,0	K+	12,71	pH	7,3
SO4=	19,4	Ca++	32,00	CE (µs/cm)	1096
Cl-	67,00	Mg++	63,1	DUREZA (mg/l)	340
NO3-	0,20	NH4+	0,000	TEMPERAT (°C)	34,80
NO2	0,050	Fe=	1,312		
PO4=	0,5				
OTRAS DETERMINACIONES					
Turbidez	0		Cobre	0,25	
Color	0		Cromo	0	
Alcalinidad	560,2		Plomo	0	
STD	709,112		SiO2	0	
CO2	62,89		Mn	0	
OBSERVACIONES:					
TIPO DE AGUA					
TERMAL					
BICARBONATADA MAGNESICA					

Fotografía N°1: Información de la ficha de clasificación por el INAMHI

Fuente: INAMHI 2013

ANEXO B: Balneario “Termas La Merced”



Fotografía N°2: Letrero del Balneario
Fuente: NARANJO, C. 2015



Fotografía N°3: Entrada principal del Balneario
Fuente: NARANJO, C. 2015

ANEXO C: Puntos de la toma de muestra para el Estudio Microbiológico



Fotografía N°4: Muestra de la piscina
Fuente: NARANJO, C. 2015



Fotografía N°5: Muestra del pozo
Fuente: NARANJO, C. 2015

ANEXO D: Medición de parámetros in-situ (multiparámetro HANNA)



Fotografía N°6: Determinación de parámetros físicos y químicos en la piscina
Fuente: NARANJO, C. 2015



Fotografía N°7: Determinación de parámetros físicos y químicos en el pozo
Fuente: NARANJO, C. 2015

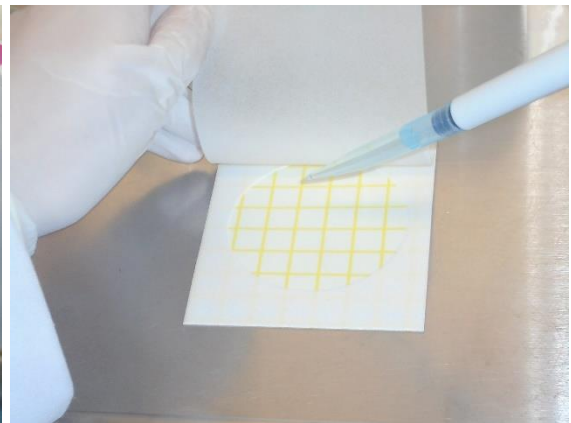
ANEXO E: Siembra por el método de petrifilm en las muestras de la piscina y del pozo.



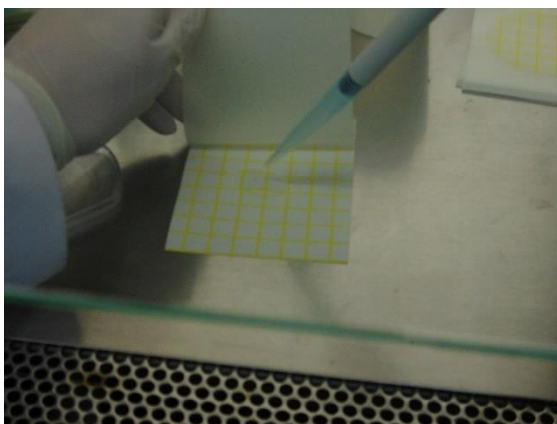
Fotografía N°8: Materiales para sembrar por el método de petrifilm
Fuente: NARANJO, C. 2015



Fotografía N°9: Siembra en Petrifilm para recuento de *E.coli*/Coliformes
Fuente: NARANJO, C. 2015



Fotografía N°10: Siembra en Petrifilm para recuento de *Staphylococcus aureus*
Fuente: NARANJO, C. 2015



Fotografía N°11: Siembra en Petrifilm para recuento de bacterias aerobias
Fuente: NARANJO, C. 2015

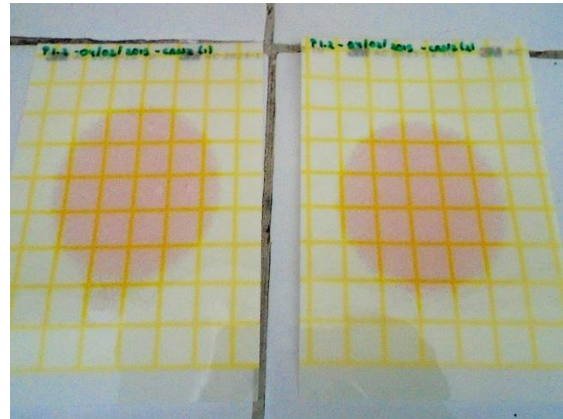


Fotografía N°12: Siembra en Petrifilm para recuento de mohos y levaduras
Fuente: NARANJO, C. 2015

ANEXO F: Resultados del recuento de bacterias de la piscina como del pozo a las 24 horas, a una temperatura de 35°C.



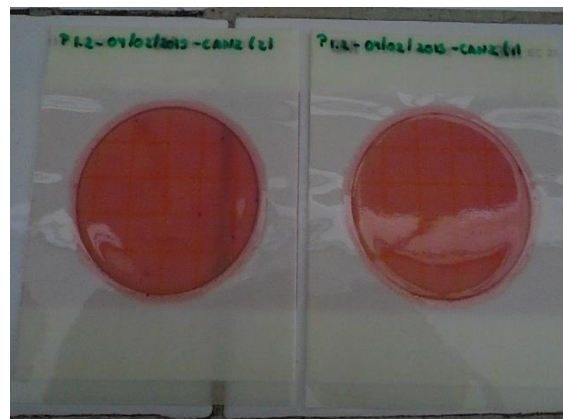
Fotografía N°13: Placas de recuento de Aerobios Totales de las muestras del pozo
Fuente: NARANJO, C. 2015



Fotografía N°14: Placas de recuento de Aerobios Totales de las muestras de la piscina
Fuente: NARANJO, C. 2015



Fotografía N°15: Placas de recuento de *E. coli* y coliformes de las muestras del pozo
Fuente: NARANJO, C. 2015



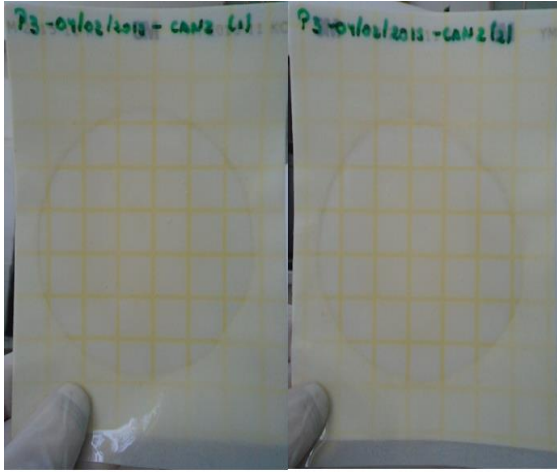
Fotografía N°16: Placas de recuento de *E. coli* y coliformes de las muestras de la piscina
Fuente: NARANJO, C. 2015



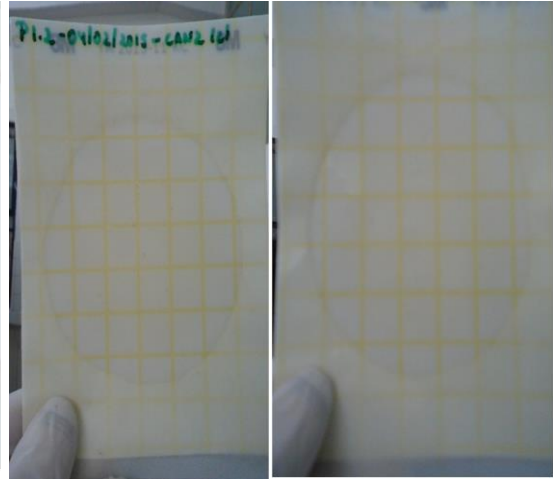
Fotografía N°17: Placas de recuento de *S. aureus* de las muestras del pozo
Fuente: NARANJO, C. 2015



Fotografía N°18: Placas de recuento de *S. aureus* de las muestras de la piscina
Fuente: NARANJO, C. 2015



Fotografía N°19: Placas de recuento de mohos y levaduras de las muestras del pozo
Fuente: NARANJO, C. 2015

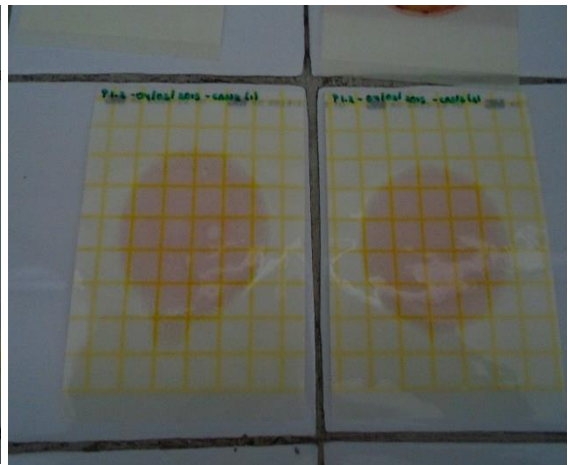


Fotografía N°20: Placas de recuento de mohos y levaduras de las muestras de la piscina
Fuente: NARANJO, C. 2015

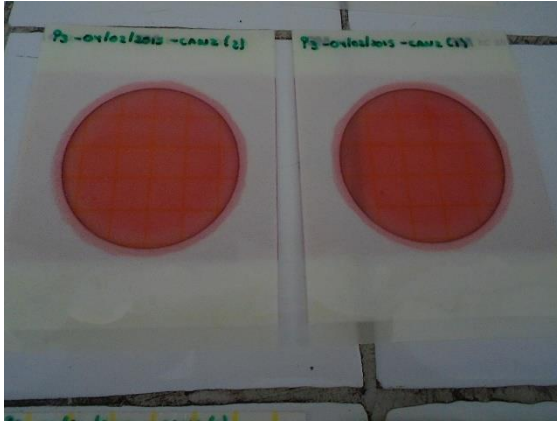
ANEXO G: Resultados del recuento de bacterias de la piscina como del pozo a las 48 horas, a una temperatura de 35°C.



Fotografía N°21: Placas de recuento de Aerobios Totales de las muestras del pozo
Fuente: NARANJO, C. 2015



Fotografía N°22: Placas de recuento de Aerobios Totales de las muestras de la piscina
Fuente: NARANJO, C. 2015



Fotografía N°23: Placas de recuento de *E. coli* y coliformes de las muestras del pozo
Fuente: NARANJO, C. 2015



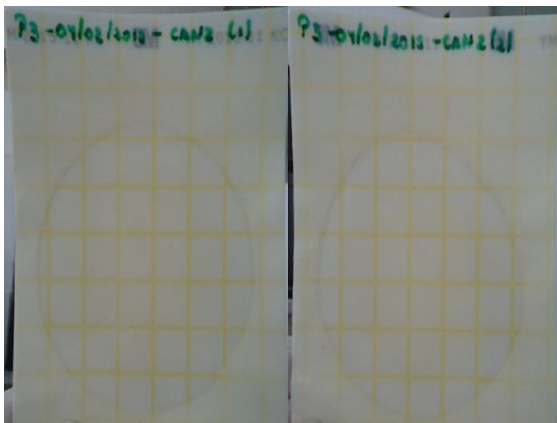
Fotografía N°24: Placas de recuento de *E. coli* y coliformes de las muestras de la piscina
Fuente: NARANJO, C. 2015



Fotografía N°25: Placas de recuento de *S. aureus* de las muestras del pozo
Fuente: NARANJO, C. 2015



Fotografía N°26: Placas de recuento de *S. aureus* de las muestras de la piscina
Fuente: NARANJO, C. 2015



Fotografía N°27: Placas de recuento de mohos y levaduras de las muestras del pozo
Fuente: NARANJO, C. 2015



Fotografía N°28: Placas de recuento de mohos y levaduras de las muestras de la piscina
Fuente: NARANJO, C. 2015

ANEXO H: Resultados del recuento de mohos y levaduras a los 7 días, a una temperatura de 25°C.

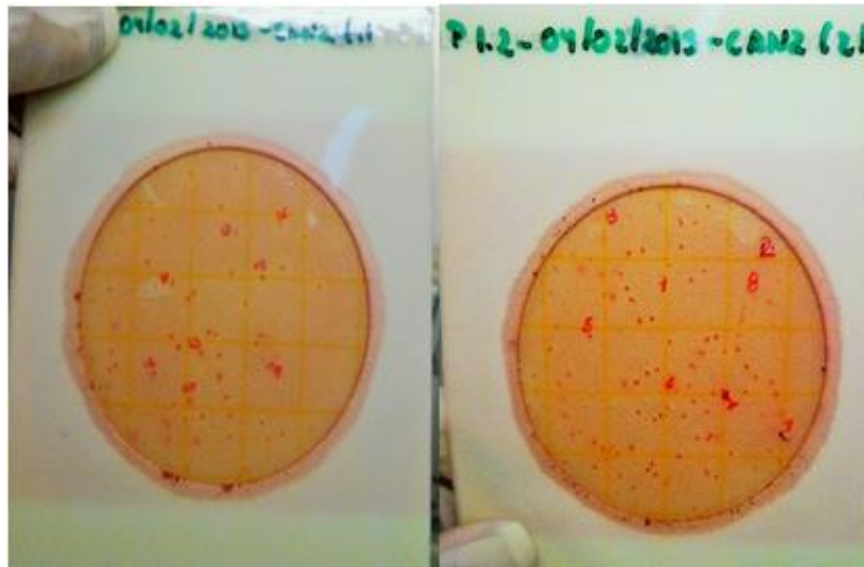


Fotografía N°29: Placas de recuento de mohos y levaduras de las muestras del pozo (7días)
Fuente: NARANJO, C. 2015



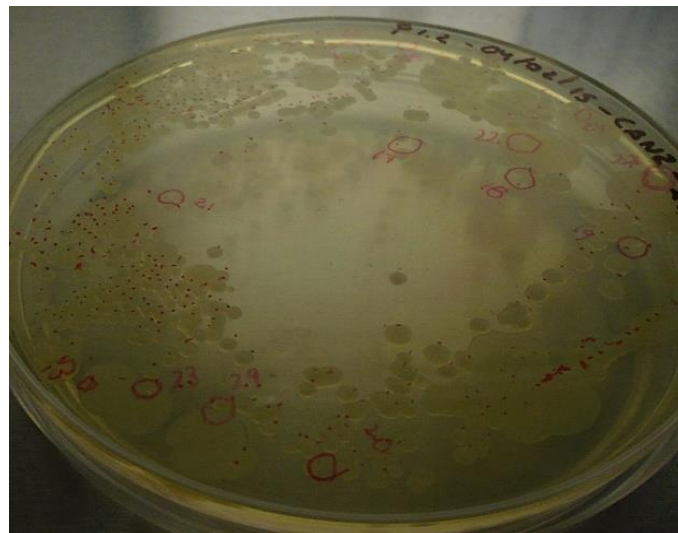
Fotografía N°30: Placas de recuento de mohos y levaduras de las muestras de la piscina (7días)
Fuente: NARANJO, C. 2015

ANEXO I: Colonias que se usaran para los repiques



Fotografía N°31: Placas de *E. coli* y coliformes escogidas para Repiques en las muestras de la piscina

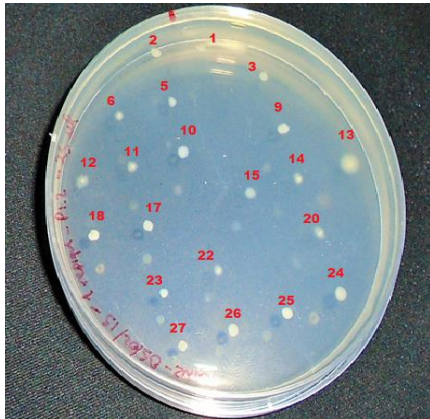
Fuente: NARANJO, C. 2015



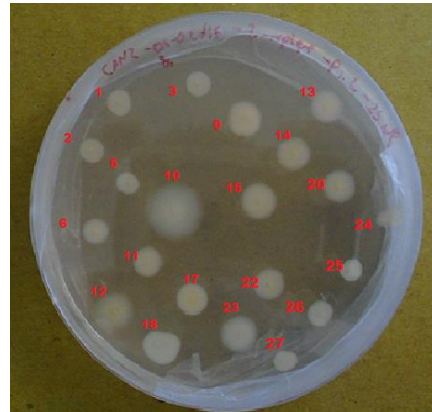
Fotografía N°32: Repiques escogidos del Agar Mueller Hinton de las muestras de la piscina

Fuente: NARANJO, C. 2015

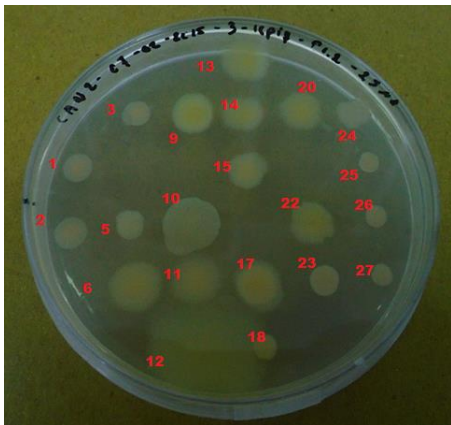
ANEXO J: Resultado de repiques de la piscina



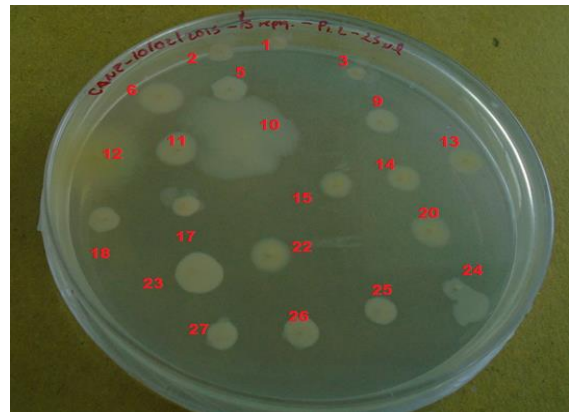
Fotografía N°33: Repique 1
Fuente: NARANJO, C. 2015



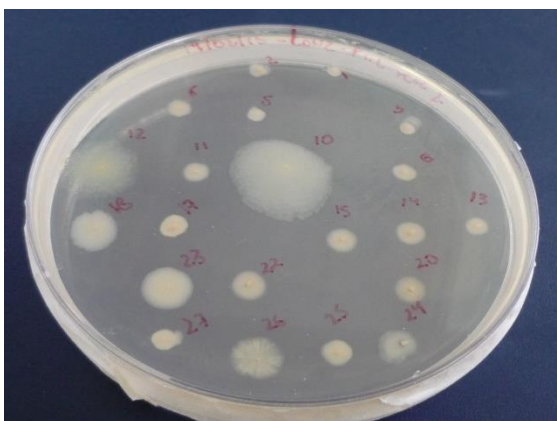
Fotografía N°34: Repique 2
Fuente: NARANJO, C. 2015



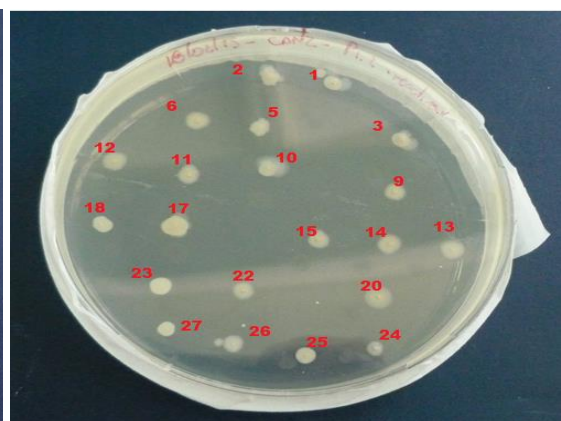
Fotografía N°35: Repique 3
Fuente: NARANJO, C. 2015



Fotografía N°36: Repique 4
Fuente: NARANJO, C. 2015

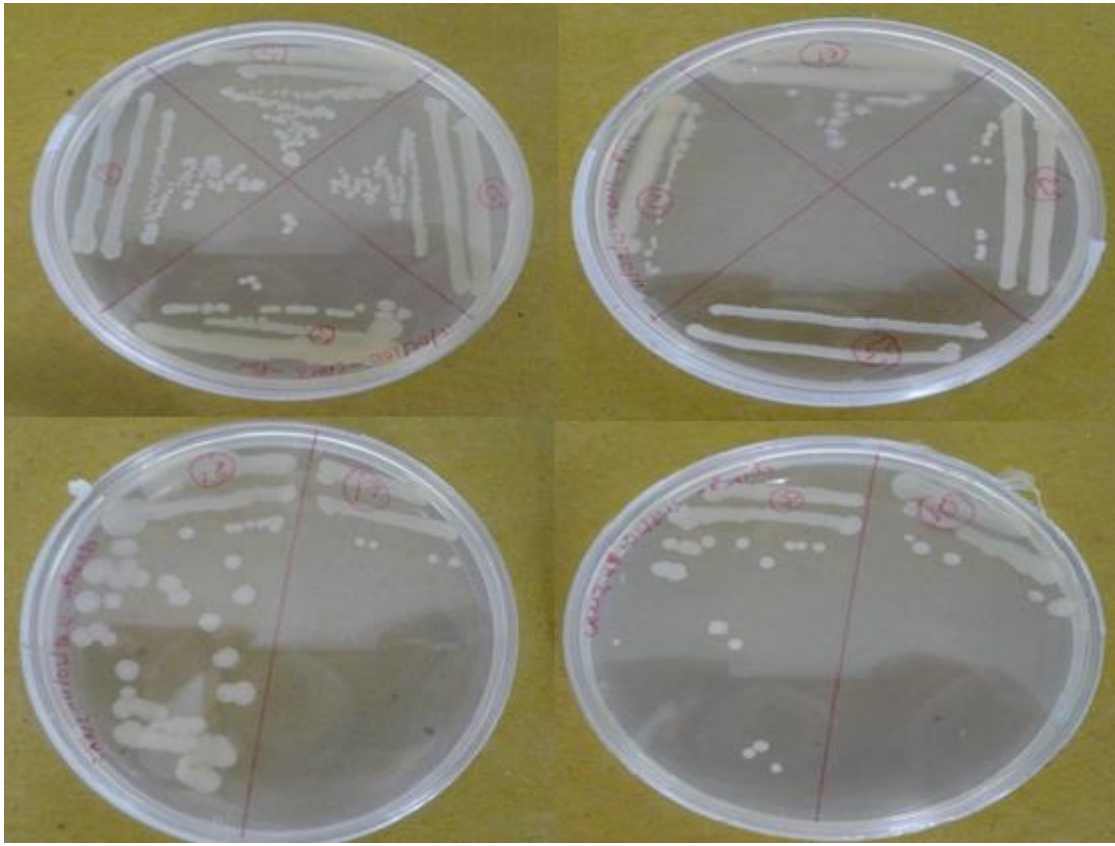


Fotografía N°37: Repique 5
Fuente: NARANJO, C. 2015



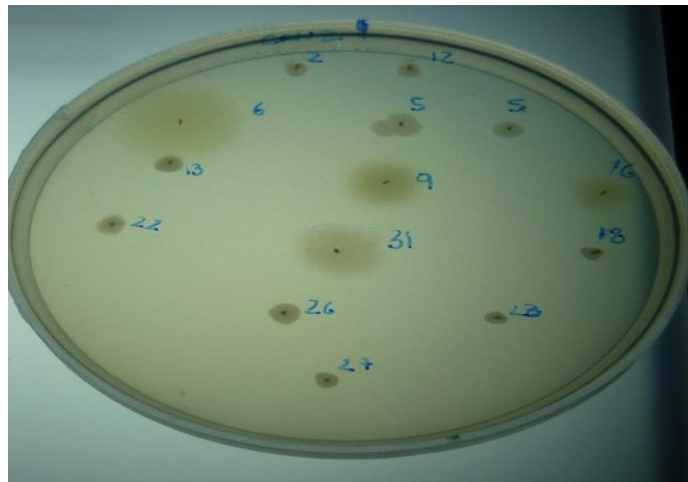
Fotografía N°38: Repique 6
Fuente: NARANJO, C. 2015

ANEXO K: Estrías de las colonias de la piscina



Fotografía N°39: Estrías de colonias de la Piscina
Fuente: NARANJO, C. 2015

ANEXO L: Clones aislados puros



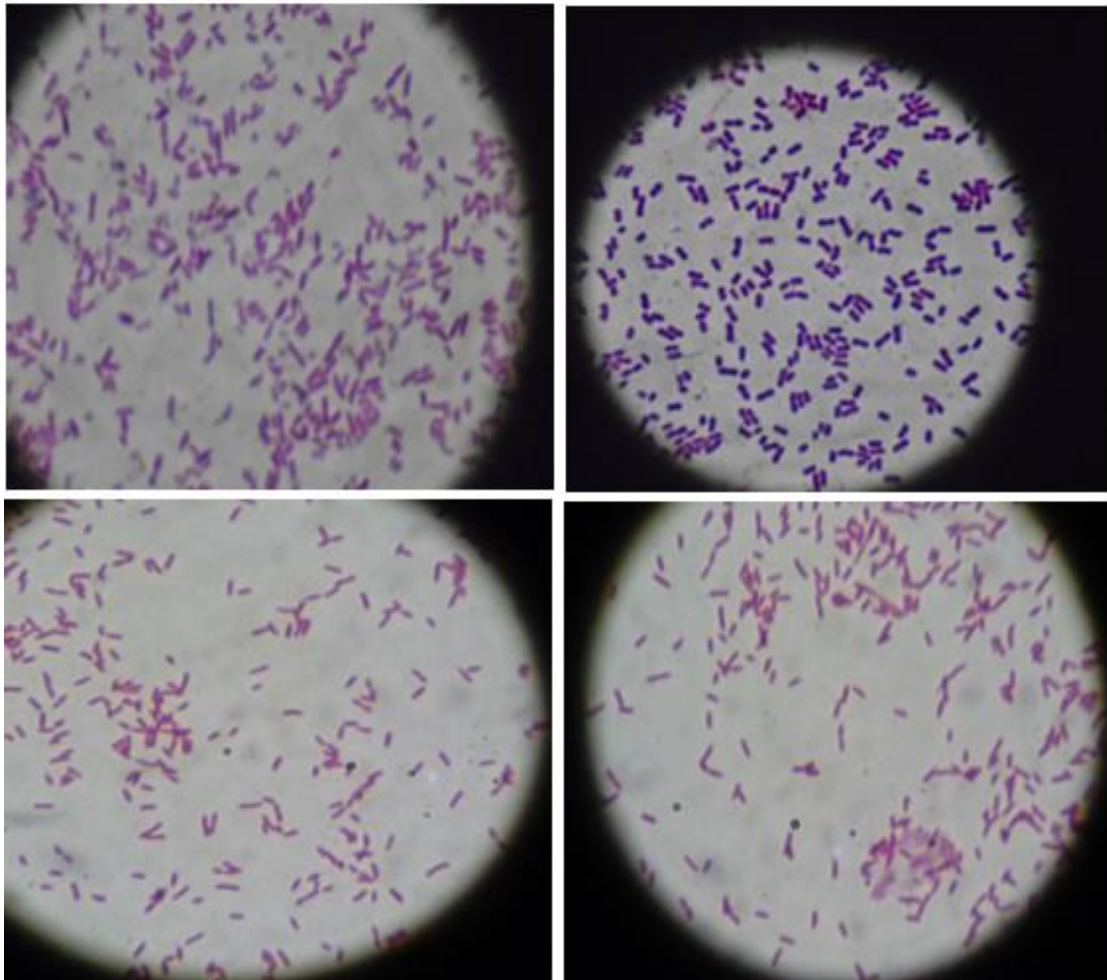
Fotografía N°40: Clones Puros de la Piscina
Fuente: NARANJO, C. 2015

ANEXO M: Tinción Gram de los clones aislados puros

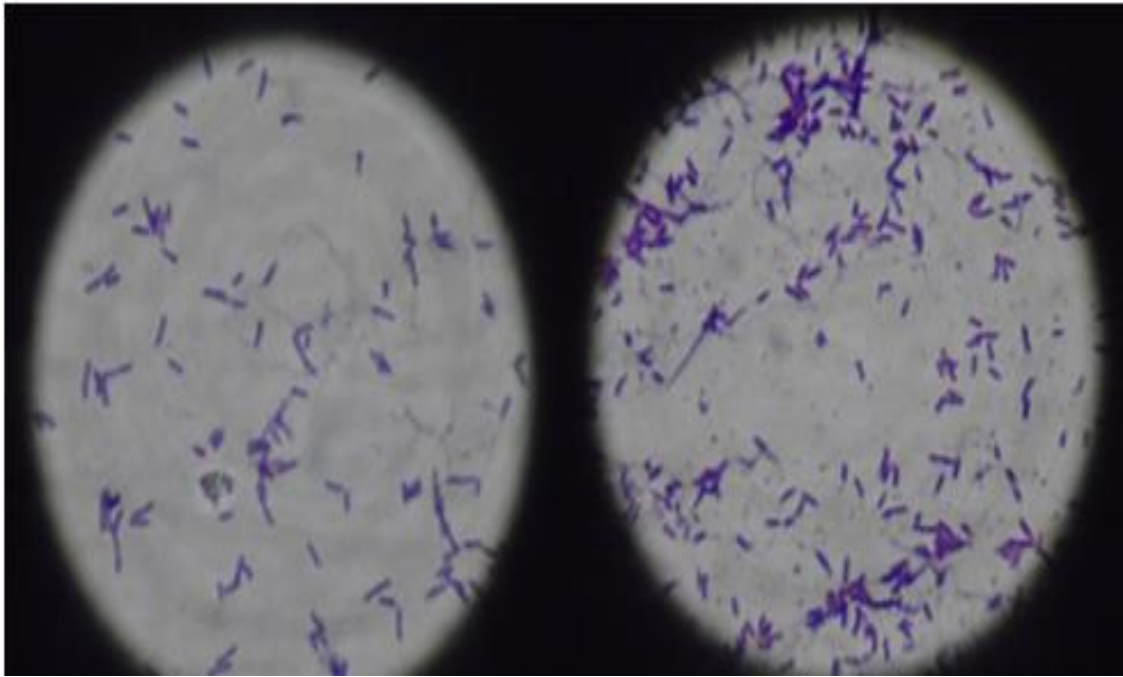


Fotografía N°41: Fijación del frotis
Fuente: NARANJO, C. 2015

Fotografía N°42: Placas para Tinción Gram de las muestras de la piscina
Fuente: NARANJO, C. 2015

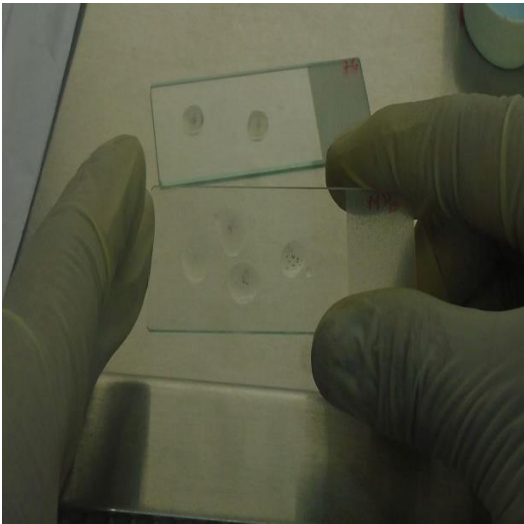


Fotografía N°43: Bacilos Gram negativos de la piscina
Fuente: NARANJO, C. 2015

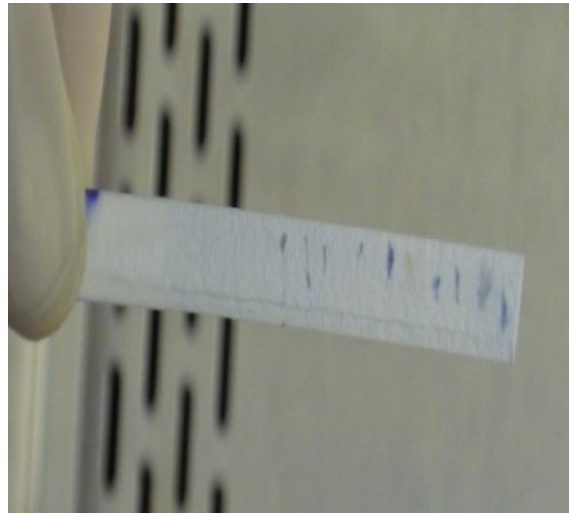


Fotografía N°44: Bacilos Gram positivos de la piscina
Fuente: NARANJO, C. 2015

ANEXO N: Prueba de la catalasa y oxidasa a clones puros

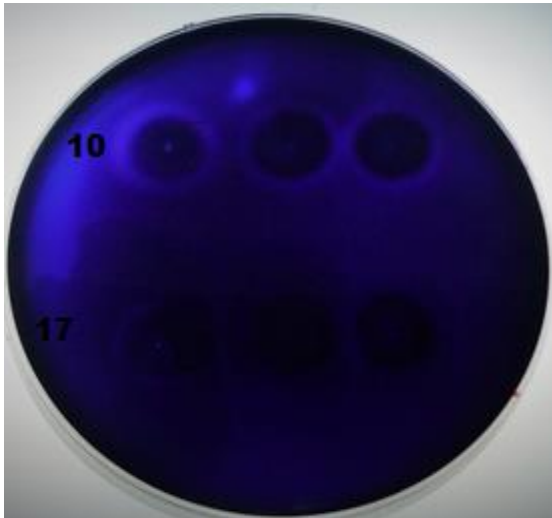


Fotografía N°45: Prueba de la catalasa
Fuente: NARANJO, C. 2015

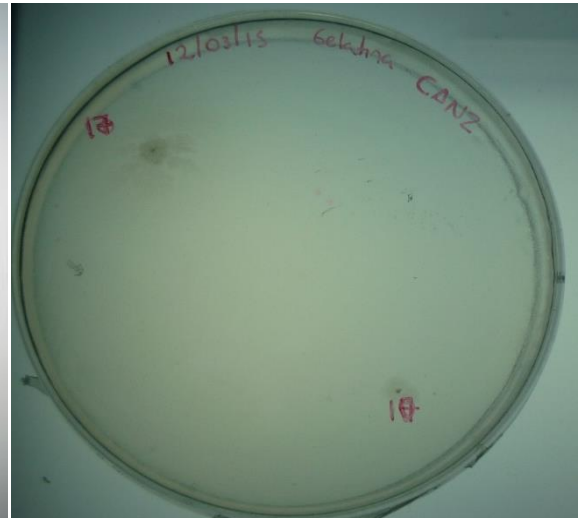


Fotografía N°46: Prueba de la oxidasa
Fuente: NARANJO, C. 2015

ANEXO O: Pruebas para la identificación de Bacilos Gram Positivos

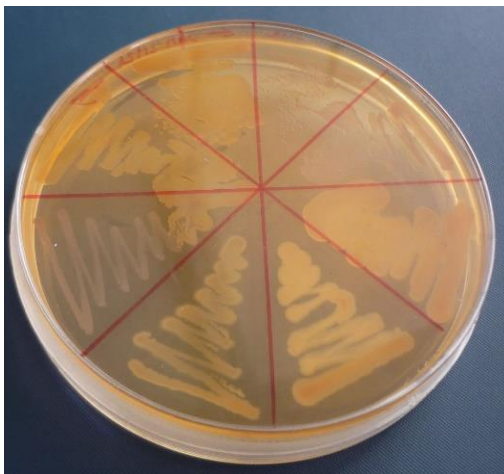


Fotografía N°47: Prueba positiva para Hidrólisis del Almidón (formación de halo)
Fuente: NARANJO, C. 2015

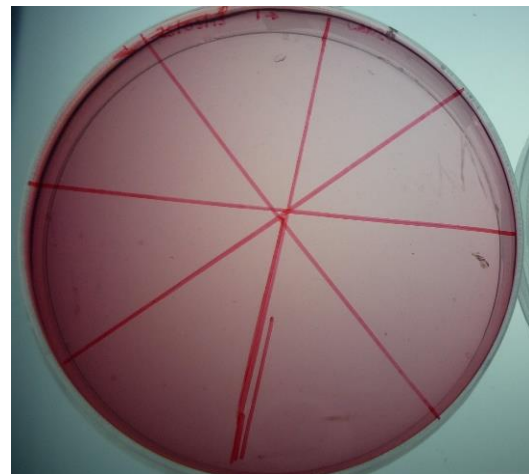


Fotografía N°48: Prueba negativa para Hidrólisis de la Gelatina.
Fuente: NARANJO, C. 2015

ANEXO P: Pruebas para la identificación de Bacilos Gram Negativos

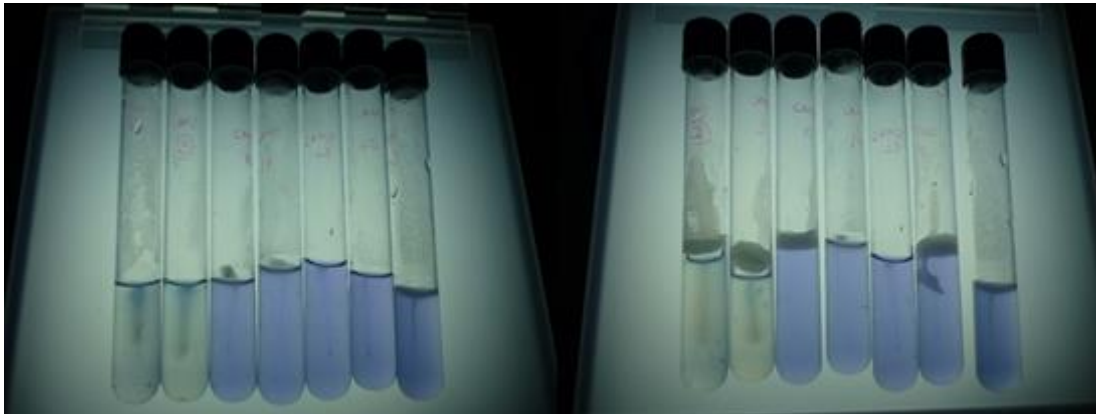


Fotografía N°49: Crecimiento de colonias en Agar MacConkey
Fuente: NARANJO, C. 2015

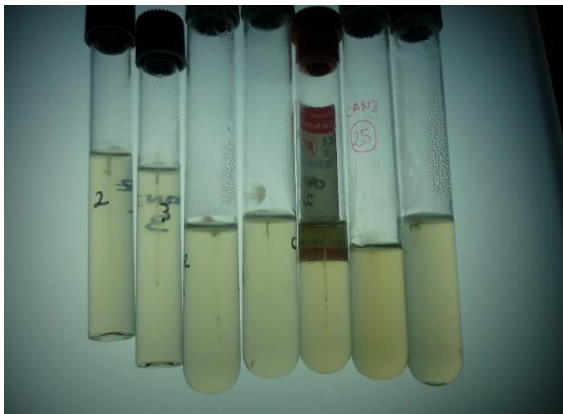


Fotografía N°50: Ausencia de crecimiento de colonias en Agar Manitol salado
Fuente: NARANJO, C. 2015

ANEXO Q: Pruebas bioquímicas Bacilos Gram Negativos



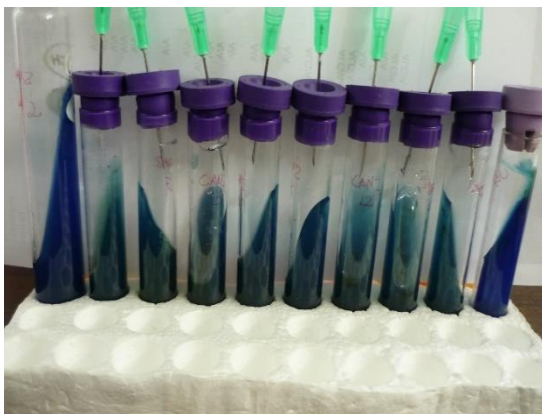
Fotografía N°51: Resultados en Agar OF con y sin vaselina estéril
Fuente: NARANJO, C. 2015



Fotografía N°52: Resultados de Agar Movilidad
Fuente: NARANJO, C. 2015



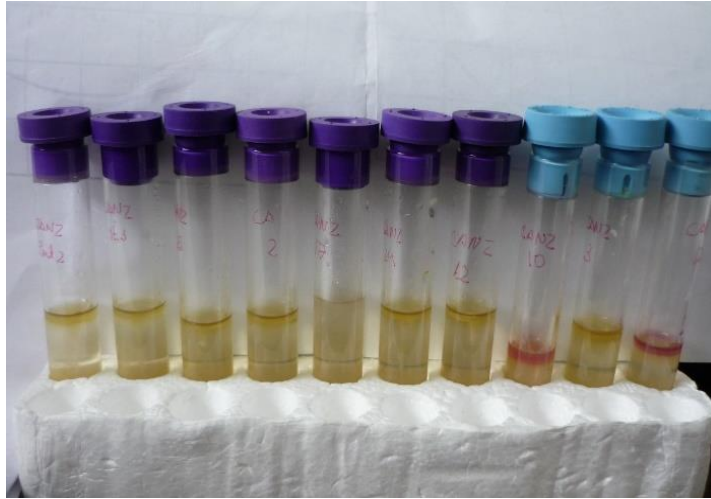
Fotografía N°53: Resultados de la prueba de Kligler
Fuente: NARANJO, C. 2015



Fotografía N°54: Resultado de la prueba de citrato
Fuente: NARANJO, C. 2015

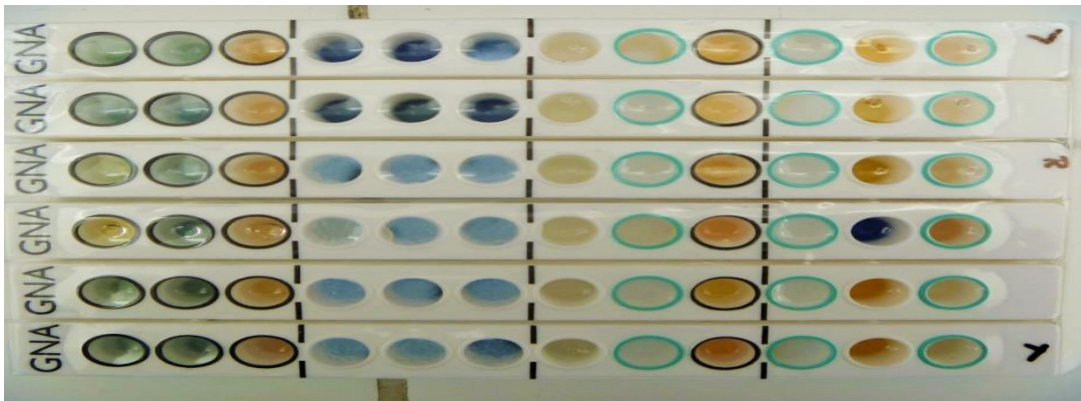


Fotografía N°55: Resultado de la prueba de ureasa
Fuente: NARANJO, C. 2015



Fotografía N°56: Resultado de la prueba SIM
Fuente: NARANJO, C. 2015

ANEXO R: Sistema Comercial Microgen™



Fotografía N°57: Resultado Tira GNA
Fuente: NARANJO, C. 2015



Fotografía N°58: Resultado Tira GNB
Fuente: NARANJO, C. 2015

ANEXO S: Antibiogramas de las especies identificadas



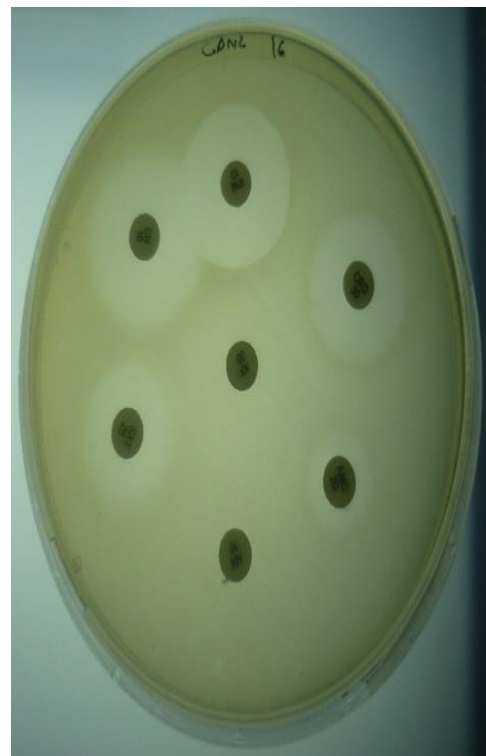
Fotografía N°59: *Brevundimonas diminuta*
Fuente: NARANJO, C. 2015



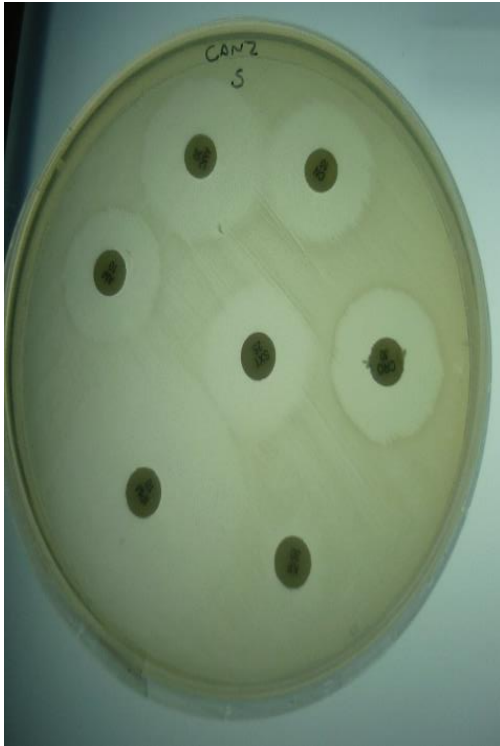
Fotografía N°60: *Acinetobacter haemolyticus*
Fuente: NARANJO, C. 2015



Fotografía N°61: *Xenorhabdus beddingii*
Fuente: NARANJO, C. 2015



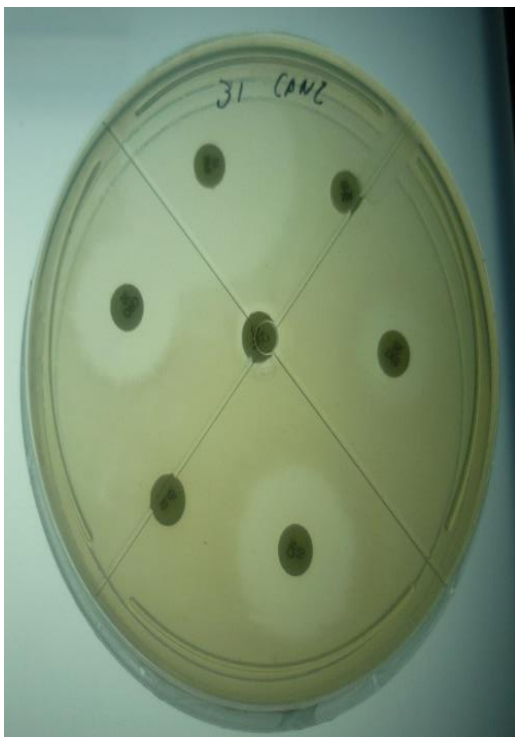
Fotografía N°62: *Aeromonas schubertii*
Fuente: NARANJO, C. 2015



Fotografía N°63: *Citrobacter amalonaticus*
Fuente: NARANJO, C. 2015



Fotografía N°64: *Budvicia aquatica*
Fuente: NARANJO, C. 2015



Fotografía N°65: *Pseudomonas stutzeri*
Fuente: NARANJO, C. 2015



Fotografía N°66: *Bacillus spp.*
Fuente: NARANJO, C. 2015

ANEXO T: Antibiograma con EDTA



Fotografía N°67: Fenotipos de resistencia de *Acinetobacter haemolyticus*
Fuente: NARANJO, C. 2015



Fotografía N°68: Fenotipos de resistencia de *Citrobacter amalonaticus*
Fuente: NARANJO, C. 2015



Fotografía N°69: Fenotipos de resistencia de *Budvicia aquatica*
Fuente: NARANJO, C. 2015



Fotografía N°70: Fenotipos de resistencia de *Aeromonas schubertii*
Fuente: NARANJO, C. 2015

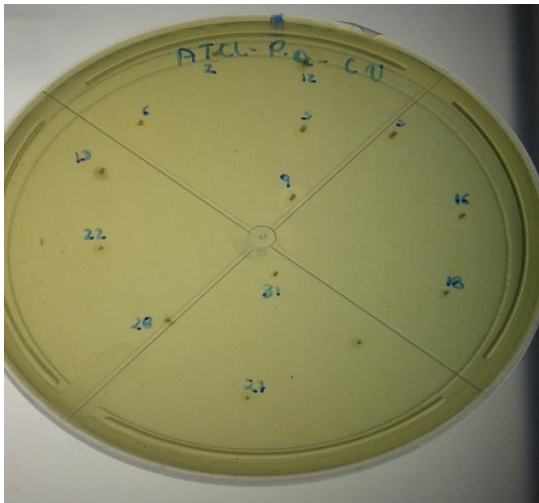


Fotografía N°71: Fenotipos de resistencia de *Brevundimonas diminuta*
Fuente: NARANJO, C. 2015

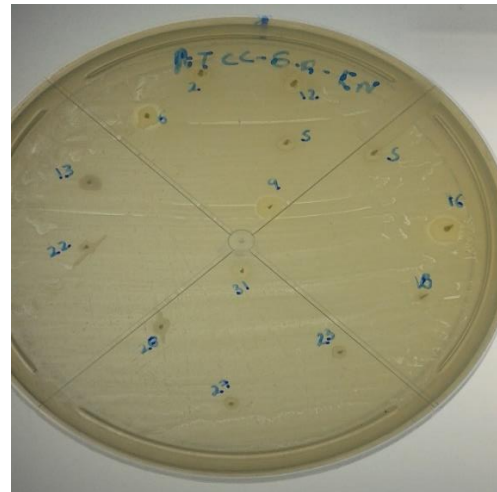


Fotografía N°72: Fenotipos de resistencia de *Pseudomonas stutzeri*
Fuente: NARANJO, C. 2015

ANEXO U: Actividad Antibacteriana de los clones aislados



Fotografía N°73: Actividad antibacteriana frente a la cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
Fuente: NARANJO, C. 2015



Fotografía N°74: Actividad antibacteriana frente a la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
Fuente: NARANJO, C. 2015