



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

**“ESTUDIO MICROBIOLÓGICO DE LAS AGUAS TERMALES DE  
GUAYLLABAMBA O AGUALLANCHÍ SITUADAS EN EL CANTÓN  
CHAMBO, PROVINCIA DE CHIMBORAZO”**

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL GRADO  
ACADÉMICO DE:  
BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA**

**AUTOR: ANA VANESA VEINTIMILLA ANDRADE**

**TUTOR: Dr. FÉLIX ANDUEZA**

**RIOBAMBA – ECUADOR**

**2015**

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

El tribunal de Tesis certifica que: El trabajo de investigación: **“ESTUDIO MICROBIOLÓGICO DE LAS AGUAS TERMALES DE GUAYLLABAMBA O AGUALLANCHÍ SITUADAS EN EL CANTÓN CHAMBO, PROVINCIA DE CHIMBORAZO”**, de responsabilidad de la estudiante egresada Ana Vanesa Veintimilla Andrade, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

**FIRMA**

**FECHA**

Dr. Félix Andueza

**DIRECTOR DE TESIS**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Dra. Sandra Escobar

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**NOTA DE TRABAJO ESCRITO:** \_\_\_\_\_

**COORDINADOR SISBIB- ESPOCH**

\_\_\_\_\_

Yo, Ana Vanesa Veintimilla Andrade, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis; y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado; pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO.

---

ANA VANESA VEINTIMILLA ANDRADE

## **DEDICATORIA**

El presente trabajo va dedicado con todo mi amor, a mis amados padres Hernán y Gladys que con su apoyo incondicional y su amor tan desinteresado han sido mi ejemplo y el pilar fundamental para poder hoy culminar esta etapa tan importante en mi vida

A mis hermanos Vale y Wily que siempre me han sacado una sonrisa y me han apoyado en todo momento

A mi abuelita Alcira por su gran cariño y sus sabios consejos siempre me ha motivado a ser mejor cada día

A mi amad@ hijit@ que está en camino por ser mi inspiración y mi mayor bendición

*Vanessa*

## AGRADECIMIENTO

A Dios por permitirme compartir día a día con mi familia, amigos y poder ser partícipe de tantas alegrías

A mis padres y hermanos por su apoyo constante durante la culminación de este ciclo, y por ser mi soporte en momentos difíciles

A los Doctores Félix Andueza, Sandra Escobar y Gerardo Medina por brindarme su amistad, sus conocimientos y su valioso tiempo para la ejecución del presente trabajo.

A mis amigos por compartir inolvidables momentos que se quedaron plasmados en mi mente y mi corazón

*Vanesa*

## ÍNDICE GENERAL

### RESUMEN

### SUMMARY

INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I.....	2
1. MARCO TEÓRICO.....	2
1.1 Marco Filosófico o epistemológico de la investigación.....	2
1.1.1. <i>Terma</i> .....	2
1.1.2. <i>Balneario</i> .....	2
1.1.1. <i>Agua mineral termal</i> .....	2
1.1.2. <i>Población</i> .....	2
1.1.3. <i>Crecimiento microbiano</i> .....	2
1.2. Antecedentes de investigación.....	3
1.3. Bases Teóricas.....	4
1.3.1. <i>Aguas termales</i> .....	4
1.3.2. <i>Clasificación de las aguas termales</i> .....	6
1.3.3. <i>Características Físicas de las aguas termales</i> .....	10
1.3.4. <i>Composición química de las aguas termales</i> .....	11
1.3.5. <i>Beneficios de las aguas termales</i> .....	12
1.3.6. <i>Tipo de Aguas termales y su uso</i> .....	13
1.3.7. <i>Microorganismo</i> .....	14
1.3.8. <i>Clases de microorganismos patógenos</i> .....	14
1.3.9. <i>Microbiología</i> .....	17
1.3.10. <i>Características microbiológicas del agua mineromedicinal</i> .....	18
1.3.11. <i>Otros microorganismos</i> .....	19
1.3.12. <i>Recuento de microorganismos</i> .....	21
1.3.13. <i>Aguas Termales de Aguallanchí o Guayllabamba</i> .....	21
CAPITULO II.....	21
2. MARCO METODOLOGICO.....	23
3. METODOLOGÍA.....	23
3.1. Características del lugar.....	23
3.2. Diseño de Investigación.....	23
3.3. Unidad de Análisis.....	25
3.4. Población de Estudio.....	25

3.5.	<b>Muestreo</b> .....	26
3.6.	<b>Ensayos Físicoquímicos “in situ”</b> .....	27
3.7.	<b>Análisis Microbiológico</b> .....	27
3.8.	<b>Descripción macroscópica de colonias</b> .....	28
3.9.	<b>Purificación de los aislados bacterianos</b> .....	28
3.10.	<b>Pruebas Bioquímica y fisiológicas realizadas a las colonias aisladas y purificadas</b> .....	29
3.10.1.	<i>Tinción Gram</i> .....	29
3.10.2.	<i>Pruebas Bioquímicas</i> .....	30
3.11.	<b>Identificación de microorganismos por el Sistema de Microgen</b> .....	32
3.11.1.	<i>Lectura y adición de reactivos</i> .....	34
3.11.2.	<i>Identificación</i> .....	35
<b>CAPITULO III</b> .....		36
4.	<b>MARCO DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	36
4.1.	<b>Parámetros físicoquímicos</b> .....	36
4.2.	<b>Bacterias Aerobias mesófilas</b> .....	37
4.3.	<b>Coliformes totales y fecales</b> .....	39
4.4.	<b>Staphylococcus</b> .....	40
4.5.	<b>Mohos y Levaduras</b> .....	41
4.6.	<b>Pruebas para Selección e Identificación de bacterias</b> .....	42
<b>CONCLUSIONES</b>		
<b>RECOMENDACIONES</b>		
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>		
<b>ANEXOS</b>		

## INDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1-1.</b> Clasificación Según V. A. Souline de acuerdo a la relación entre la Concentración de iones Sodio, Cloro, Sulfatos y Magnesio.....	9
<b>Cuadro 2-1.</b> Clasificación de acuerdo a su relación iónica.....	9
<b>Cuadro 3-1.</b> Clasificación de acuerdo a su conductividad eléctrica.....	10
<b>Cuadro 4-1.</b> Criterios de calidad para piscinas con aguas termales.....	21
<b>Cuadro 5-1.</b> Análisis realizados por el INAMHI en las Aguas Termales de Guayllabamba.....	22



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1-2.</b> Ubicación de las Aguas termales de Guayllabamba.....	24
<b>Figura 2-2.</b> Representación esquemática del procedimiento.....	25
<b>Figura 3-2.</b> Sitios de muestreo del agua termal de Guayllabamba.....	26
<b>Figura 4-2.</b> Ilustración gráfica de la Siembra en placas Petrifilm.....	28
<b>Figura 5-2.</b> Interpretación de colores posterior a la incubación del Microgen y adición de reactivos específicos.....	33
<b>Figura 6-3.</b> Resultado de las Bacterias Aerobias mesófilas en Placas Petrifilm.....	37

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1-3.</b> Resultado de las Bacterias <i>Staphylococcus aureus</i> procedentes del agua termal de Guayllabamba.....	40
<b>Gráfico 2-3.</b> Resultado de Mohos y Levaduras procedentes del agua termal de Guayllabamba.....	41
<b>Gráfico 3-3.</b> Número y porcentaje de bacterias Gram positivas y Gram negativas aisladas, procedentes del agua termal de Guayllabamba.....	42
<b>Gráfico 4-3.</b> Resultado de las pruebas bioquímicas realizadas a las bacterias Bacilos Gram (-) procedentes del agua termal de Guayllabamba.....	44
<b>Gráfico 5-3.</b> Resultado de las pruebas de oxidasa positiva y negativa de las bacterias aisladas procedentes del agua termal de Guayllabamba.....	45
<b>Gráfico 6-3.</b> Resultado de las pruebas de catalasa positiva y negativa de las bacterias aisladas procedentes del agua termal de Guayllabamba.....	46

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1-1.</b> Clasificación de las aguas minerales según el contenido químico, acción terapéutica y compuestos sobresalientes.....	7
<b>Tabla 2-2.</b> Ubicación geográfica de las Aguas termales de Guayllabamba.....	24
<b>Tabla 3-2.</b> Prueba Kligler. Producción de ácidos.....	32
<b>Tabla 4-3.</b> Resultados de los parámetros físicoquímicos “in situ” del Agua termal de Guayllabamba en los dos puntos de muestreo.....	36
<b>Tabla 5-3.</b> Resultado de las Bacterias <i>Aerobias mesófilas</i> en Placas Petrifilm procedentes del agua termal de Guayllabamba.....	37
<b>Tabla 6-3.</b> Resultado de <i>Coliformes totales y fecales</i> procedentes del agua termal de Guayllabamba.....	39
<b>Tabla 7-3.</b> Resultado de <i>Staphylococcus aureus</i> procedentes del agua termal de Guayllabamba.....	40
<b>Tabla 8-3.</b> Resultado de Mohos y Levaduras procedentes del agua termal de Guayllabamba.....	41
<b>Tabla 9-3.</b> Número y porcentaje de bacterias Gram positivas y Gram negativas aisladas, procedentes del agua termal de Guayllabamba.....	42
<b>Tabla 10-3.</b> Resultado de las pruebas bioquímicas realizadas a las bacterias Bacilos Gram (-) procedentes del agua termal de Guayllabamba.....	43
<b>Tabla 11-3.</b> Resultado de las pruebas de oxidasa positiva y negativa de las bacterias aisladas procedentes del agua termal de Guayllabamba.....	45
<b>Tabla 12-3.</b> Resultado de las pruebas de catalasa positiva y negativa de las bacterias aisladas procedentes del agua termal de Guayllabamba.....	46
<b>Tabla 13-3.</b> Resultado de las pruebas realizadas a las bacterias bacilos Gram negativas procedentes del agua termal de Guayllabamba.....	47
<b>Tabla 14-3.</b> Resultado de las pruebas realizadas a las bacterias Gram positivas procedentes del agua termal de Guayllabamba.....	48
<b>Tabla 15-3.</b> Bacterias identificadas procedentes del agua termal de Guayllabamba.....	49

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo A:</b> Esquema de Identificación Bacteriana de las Aguas termales de Guayllabamba.....	61
<b>Anexo B:</b> Balneario Aguas termales de Guayllabamba.....	62
<b>Anexo C:</b> Punto de emergencia del Agua termal de Guayllabamba.....	62
<b>Anexo D:</b> Multiparámetro utilizado para medir los parámetros fisicoquímicos del Agua termal.....	62
<b>Anexo E:</b> Instrumento utilizado para medir las coordenadas geográficas del lugar.....	62
<b>Anexo F:</b> Medición de Parámetros fisicoquímicos en el punto de emergencia.....	62
<b>Anexo G:</b> Recolección de la muestra de agua.....	63
<b>Anexo H:</b> Cámara de Flujo utilizada para la realización de este estudio.....	63
<b>Anexo I:</b> Placas Petrifilm usadas para el estudio microbiológico.....	63
<b>Anexo J:</b> Placas Petrifilm a las 48 horas de incubación.....	64
<b>Anexo K:</b> Siembra en Mueller Hinton.....	66
<b>Anexo L:</b> Purificación de los aislados bacterianos.....	66
<b>Anexo M:</b> Aislados bacterianos.....	66
<b>Anexo N:</b> Obtención de cultivos puros.....	67
<b>Anexo O:</b> Tinción Gram de las colonias bacterianas aisladas y purificadas.....	68
<b>Anexo P:</b> Pruebas bioquímicas.....	69
<b>Anexo Q:</b> Sistema de Microgen.....	70

## RESUMEN

Se realizó un estudio microbiológico en muestras de agua mineromedicinal recolectadas en puntos emergentes ubicados en las aguas termales de Guayllabamba en Chambo, Provincia de Chimborazo, Ecuador, con el objetivo de determinar su calidad microbiológica y a la vez conocer su microbiota autóctona. Se realizó un análisis físico-químico para la determinación de temperatura, pH, sólidos totales disueltos y conductividad, también se realizaron análisis microbiológicos mediante la técnica de siembra en placas Petrifilm, posteriormente se realizó la purificación de las bacterias a través de un aislado para la obtención de cultivos puros, a todas las bacterias purificadas se les realizó la técnica de Tinción de Gram para clasificarlas en positivas o negativas, y, de acuerdo a ello realizar las pruebas bioquímicas correspondientes para cada grupo, finalmente a las bacterias no identificadas aún posterior a las pruebas bioquímicas se les practicó el Método de identificación por el Sistema de Microgen™ GN-ID, de esta manera se pudo hallar en estas aguas mesotermales la existencia en mayor proporción de Bacterias bacilos Gram negativos, y en menor cantidad bacilos y cocos Gram positivos, así como la presencia de los géneros, *Methylobacterium* (14 %), *Moraxella* (14%), *Bacillus* (29%), y las especies *Ralstonia pickettii* (29%) y *Staphylococcus aureus* (14%). Por lo que se concluye que las aguas termales presentan una microbiota autóctona escasa con mayor cantidad de microorganismos Gram negativos, siendo los géneros y especies *Ralstonia pickettii*, *Methylobacterium spp* y *Moraxella spp*, los primeros registrados en estudios de las aguas termales de Guayllabamba en Ecuador. Es necesario señalar que la cantidad de cepas aisladas en la investigación, no representa un mayor peligro para la salud de las personas que acuden a este balneario termal; Se recomienda a la Junta Parroquial de Guayllabamba realizar análisis profundo de las herramientas utilizadas para la limpieza de estas piscinas a fin de llegar al origen de la pequeña contaminación de estas aguas; garantizando el bienestar de la salud de la Comunidad y de las personal en general.

**Palabras clave:** <MANANTIAL TERMAL>, <MICROBIOTA AUTÓCTONA>, <MICROBIOLÓGICO>, <GUAYLLABAMBA>, <BALNEARIO>, <CHAMBO>, <BACTERIAS>, <DIVERSIDAD MICROBIANA>.

## SUMMARY

A microbiological study was performed on samples of mineral water collected in emerging place located in the thermal waters of Guayllabamba in Chambo, Province of Chimborazo, Ecuador, in order to determine its microbiological quality and get in its native microbiota. A physical and chemical analysis was performed for determining temperature, pH, total dissolved solids and conductivity, microbiological analysis were also performed using the technique about sowing in Petrifilm plates, later the bacteria purification were performed through an insulated for obtaining pure bacteria all the purified bacteria underwent by the Gram stain technique for classification in positive or negative, and, accordingly perform the corresponding biochemical tests for each group, finally unidentified bacteria even after biochemical tests were analyzed by a method of identification called System Microgen™ GN-ID, by this way was found in these waters the existence in a big proportion of Gram negative bacilli bacteria, and low bacilli and Gram positive coccus and also the presence of gender *Methylobacterium* (14%), *Moraxella* (14%), *Bacillus* (29%), and *Ralstonia pickettii* (29%) and *Staphylococcus aureus* (14%) species. This study concluded that the thermal waters have poor native microbiota with more of Gram negative microorganisms, with the gender and species *Ralstonia pickettii*, *Methylobacterium spp*, and *Moraxella spp*, the first registered in thermal waters of Guayllabamba in Ecuador studies. It should be noted that the number of strain bacterial isolated in the research, is not a big health danger for people who comes to this hot spring resort. It recommended to local authorities perform deep analysis of the tools used for cleaning these pools to find the small pollution in this water; ensuring the welfare of community and whole people health.

**Keywords:** <THERMAL SPRING>, <NATIVE MICROBIOTA>, <MICROBIOLOGICAL>, <GUAYLLABAMBA>, <SPRING RESORT>, <CHAMBO>, <BACTERIA>, <MICROBIAL DIVERSITY>.

## INTRODUCCIÓN

Los balnearios de aguas termales debido a sus características excepcionales hoy en día forman parte de los establecimientos públicos con mayor afluencia de personas por atribuírseles múltiples beneficios para la salud, por lo que se debe prestar una mayor vigilancia sanitaria, ya que concurren gente de toda clase y edad, que se encuentran con diversas enfermedades que pueden poner en riesgo la salud de los bañistas. (RODÉS, B. 2000)

Innegablemente el aspecto más importante a controlar en estas zonas recreativas es la calidad microbiológica de las aguas termales y de esta manera evidenciar la pureza bacteriológica, condición obligatoria que debe cumplir el agua para garantizar la salud de la población que hace uso de estas instalaciones.

Considerando la demanda permanente y creciente de gente que concurre a estos sitios ya sea por motivos de esparcimiento o recuperación de ciertas patologías, está suficientemente justificada la necesidad de llevar una inspección microbiológica rigurosa, con el objetivo de verificar el estado sanitario y garantizar el cumplimiento de la calidad microbiológica de las mismas. (DELGADO, M. 1992)

Por tal motivo el objetivo de esta investigación fue realizar estudios físicos y microbiológicos correspondientes de las aguas termales de Guayllabamba pertenecientes al cantón Chambo, provincia de Chimborazo, trabajo realizado en el Laboratorio de Microbiología de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, para conocer la biodiversidad microbiana de las mismas y determinar su calidad microbiológica, aporte que ayudará a fortalecer el turismo comunitario de la zona y permitirá garantizar el bienestar de los usuarios como lo contempla en el plan del buen vivir enmarcado en la constitución de la república del Ecuador.

## CAPITULO I

### 1. MARCO TEÓRICO

#### 1.1 Marco Filosófico o Epistemológico de la investigación

##### 1.1.1. *Terma*

“Tomando como referencia el griego y posteriormente el latín, proviene de la palabra *Thermae-thermarum*, que equivaldría al lugar de surgencia de las aguas calientes o baños de agua caliente. (PÉREX, María. 1997).

##### 1.1.2 *Balneario*

Institución sanitaria cuyos tratamientos se basan en el uso de aguas mineromedicinales declaradas de utilidad pública o fangos aplicados mediante técnicas hidrotermales diversas según prescripción médica. (LÓPEZ, J., & RUBIO, J. 2002).

##### 1.1.1 *Agua mineral termal*

“Agua mineral termal. Agua mineral cuya temperatura de surgencia debe ser superior al menos en 4 grados centígrados, a la media anual ambiental del lugar donde emergen, permitiendo utilizar su acción calorífica.” (FAGUNDO, J., et al. 1996).

##### 1.1.2 *Población*

“Es la totalidad del fenómeno a estudiar en donde las unidades de población poseen una característica común, la cual se estudia y da origen a los datos de la investigación” (ARIAS. 2006). Otra definición también señala como “el conjunto de todos los casos que concuerdan con una serie de especificaciones” (HERNÁNDEZ SAMPIERRI. 2007).

##### 1.1.3 *Crecimiento microbiano*

Es el aumento del número de microorganismos a lo largo del tiempo, es decir el crecimiento demográfico de una población. (TORTORA, G., et al. 2007).



## 1.2 Antecedentes de investigación

El estudio de los microorganismos concurrentes en el agua data desde hace muchos años atrás, poniendo énfasis principalmente en el estudio de las bacterias patógenas presentes, a fin de inspeccionar las enfermedades transmitidas por este medio.

Los primeros estudios microbiológicos de aguas minerales, se efectuaron en España, iniciaron cuando un farmacéutico llamado Pablo Prolongo relata la naturaleza orgánica de los copos que flotan en las aguas del balneario de Carratraca, denominándolos Sulfurariacarratraquense, años más tarde el Dr. Eduardo Moreno efectuó investigaciones microscópicas de las aguas de diversos balnearios, observando bacterias, “sulfurarias”, algas y hongos. Con el transcurso de los años se siguieron haciendo estudios microbiológicos más completos. (DE LA ROSA, J., & MOSSO, M. 2000).

Uno de estos análisis más avanzados los realizó del Dr. Santiago García Fernández en un Balneario en Vizcaya, en el que no solamente observó microscópicamente, sino que a más de ello realizó recuentos y cultivos de microorganismos llegando a la conclusión de la existencia de *Beggiatoa*, *Leptothrix*, *Bacillus* y *Micrococcus*. Además concluyó que estos análisis son indispensables dentro de los análisis químicos debido a que es de gran importancia saber la efectividad de microorganismos beneficiosos o no para el organismo en las llamadas “aguas medicinales”, a fin de prevenir patologías a futuro. (DE LA ROSA, J., & MOSSO, M. 2000).

Igualmente en España en El balneario de Baños de Montemayor se realizó un estudio en el que se detalla y la estructura macro y microscópica de la «Baregina» y el ecosistema microbiano un tipo de Sulfuretum. Su microscopía destaca una relevante diversidad morfológica bacteriana, sobresaliendo la *Beggiatoa*, al igual que predadores eucarióticos bacteriovóricos, como amebas y el ciliado *Cyclidium* cf *glaucoma*. (TORELLA MATEU, F. 2006).

En la fuente termal de O Tinteiro (Ourense, España) se evaluó la existencia de contaminación en la fuente antes mencionada, se determinó la presencia/ausencia de coliformes fecales y totales, *Enterococcus*, *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium sulfito-reductores* y *Salmonella* mediante las técnicas gubernamentales de análisis microbiológicos de aguas potables de consumo directo especificados en el BOE número 268 de 9 de Noviembre de 1983. (VENDRELL, M., et al. 1998).

Así mismo estudios microbiológicos se han registrado en México - Santa Fe en las aguas termales de Garate, realizados por el Dr. Jesús Ramírez indicaron que en “dichas aguas presentan un pH mayor a 8 (alcalinas), señalando que normalmente el pH de las aguas termales por estar relacionado

con fenómenos volcánicos son muy acidas de pH entre 1 y 3; por lo cual señala que estas aguas estudiadas son telúricas y no magmáticas”. (RAMÍREZ SANDOVAL.s.f.).

Otro estudio microbiológico realizado en Octubre del 2001 en Ecuador por LABOLAB (análisis de alimentos, aguas y afines) en las Aguas termales de Nono proveniente de una vertiente, provincia de Pichincha, arrojó como resultado que dichas aguas son de calidad y por lo tanto aptas para el consumo humano. (MOYA, V., et al. 2006).

Un estudio similar realizado en microcuenca del río Blanco cuyos resultados arrojan un pH de 7,19, T° 10,6; entre otras mediciones fisicoquímicas concluyendo que presenta una calidad de agua buena para los afluentes y regular en la desembocadura debido a la presencia de ciertos macro invertebrados. (YUNGÁN, J. 2010).

Actualmente estudios ecológicos acerca de la Microbiota de manantiales termales han transformado la perspectiva de la biodiversidad microbiana, su composición y función, por ello con esta investigación se pretende dar a conocer la variedad de microorganismos que habitan en las aguas minerales termales, basándose en que no se han realizado estudios microbiológicos en las aguas termales del Ecuador.

Cabe recalcar que en las Aguas termales de Guayllabamba no se han reportado estudios microbiológicos, únicamente se han realizado estudios Físico Químicos, motivo por el cual no se citan antecedentes relacionados con la presente investigación. (INAMHI, 2013)

## **1.3 Bases teóricas**

### ***1.3.1 Aguas termales***

Son aguas que emergen del suelo con más de 5°C que la temperatura superficial, procedentes de capas subterráneas de la Tierra que se hallan a mayor temperatura, las cuales son ricas en diferentes minerales lo cual permite su uso en la terapéutica como baños, inhalaciones, irrigaciones, y calefacción. Usualmente se localizan a lo largo de líneas de fallas donde pueden almacenarse las aguas subterráneas que se calientan al llegar a cierta profundidad y posteriormente emergen en forma de agua caliente. (MÉNDEZ, A. 2010).

“Según la Ley que regula las aguas minerales, termales y de manantial y los establecimientos balnearios en Galicia, España, las define “Aguas minero-medicinales son las alumbradas natural o

artificialmente y que por sus características y cualidades sean declaradas de utilidad pública y apta para tratamientos terapéuticos”. (MOURELLE, María., et al. 2009).

“Aguas termales y minerales se caracterizan por temperaturas más altas, respectivamente, por los contenidos minerales disueltas elevadas. Las aguas termales son aguas naturales por encima del umbral de 20 ° C, se pueden utilizar para tratamientos de spa o, a temperaturas de más de 40 ° - 50 ° C para calefacción geotérmica o la producción de electricidad (energía geotérmica). Las aguas termales lo general cuentan con una mayor cantidad de solutos minerales.” (DIEPOLDER, G. 2013).

“Aguas minerales generalmente se definen como aguas con sólidos disueltos totales (TDS) de más de 1 g por litro (aunque en Francia aguas menos mineralizadas pueden ser etiquetados "minéraleeau"). Aguas minerales se utilizan en los balnearios o en la industria de bebidas.” (DIEPOLDER, G. 2013).

“Aguas mineromedicinales constituyen “una suerte de estado especial de la materia, merced al cual son posibles reacciones no referibles a los tipos de las reacciones químicas ordinarias en medio homogéneo, sino referibles a las reacciones en medio físicamente complejo, polifásicas”.(SAN MIGUEL DE LA CAMARA, M. 1956).

“Las aguas minerales constituyen un recurso natural que yace en estratos acuíferos subterráneos. Se diferencian claramente de las aguas de consumo ordinario por su grado de mineralización; la presencia de determinados componentes y por poseer estables la composición química, la temperatura, el caudal y la microflora saprofítica”. (ARMIJO, M., & SAN MARTÍN, J. 1994. FAGUNDO, J. 1996).

**Terma.** Se denomina de esta manera a un lugar que ha sido creado específicamente para el relax de las personas que acudan, consiste de una pileta dentro de la cual se encuentra agua caliente ya sea de manera natural o artificial, poseen un color verdoso característico debido a su elevada temperatura. Comúnmente utilizadas desde la antigüedad principalmente por la cultura Romana, donde se hallaban en varios lugares. (<http://www.definicionabc.com/general/terma.php> . 2007).

“A nivel histórico-arquitectónico, la define como un establecimiento público de baños” (MOLINA, J. 1997).

**Termalismo.** El termalismo es una manera de mantener, alcanzar o recuperar la salud mediante curas termales cuya intensidad, duración y frecuencia son establecidas por un médico, preferiblemente acompañadas por un programa de dieta sana y ejercicio. Es además una forma

placentera y relajante de descansar o simplemente, disfrutar de unas vacaciones saludables. (CARRERA, V., & LAINEZ, A. 2002).

### **1.3.2. Clasificación de las aguas termales**

*Según su temperatura:*

- Aguas Hipertermales o muy calientes: más de 40 ° C
- Aguas Mesotermales o calientes: entre 30 a 40 ° C
- Aguas Hipotermales o templadas: entre 20-30 ° C
- Aguas frías: inferior a 20 °C (GÓMEZ, D., et al. 2005. p 205).

*Por su composición mineral:*

- Aguas ferruginosas: poseen hierro en su composición (ANÓNIMO. 2011).
- Aguas cloruradas: tienen más de 1 g/L de sustancias mineralizantes, el ion cloruro se encuentra acompañado frecuentemente de sodio en proporción semejante. Esta agua manifiesta un origen subterráneo y la presencia de mares arcaicos. La existencia de fallas y grietas favorece su ascenso a la superficie. Se subdividen en: fuentes (más de 50 g/L), medianas (entre 10 y 50 g/L) y débiles (menos de 10 g/L). (CHILUIZA, E. 2009).
- Aguas sulfuradas y sulfurosas: poseen azufre, las sulfuradas son ácidas y lodosas (ANÓNIMO. 2011).
- Aguas sulfatadas: tienen mayor a 1 g/L de sustancias mineralizantes, prevaleciendo el anión sulfato, además pueden contener otros iones con propiedades terapéuticas como sodio, magnesio, bicarbonato y cloruro. (CHILUIZA, E. 2009).
- Aguas bicarbonatadas: poseen bicarbonato, son aguas frías y alcalinas, pueden ser sódicas, cálcicas, mixtas, cloruradas o sulfatadas. Poseen más de 1 g/L de sustancia mineralizante, en el que el ion bicarbonato puede estar conjuntamente con calcio, magnesio, sodio, cloruro y otros. Estas aguas cuando poseen gran cantidad de ácidos libres (CO<sub>2</sub> mayor de 250 mg/L), también se denominan carbónicas o carbo gaseosas (CHILUIZA, E. 2009).
- Aguas con mineralización inferior a 1 g/L: se conocen como aguas oligominerales. En ellas la mineralización es inferior a 1 g/L, aunque pueden poseer abundante cantidad de los microelementos: cobalto, vanadio, molibdeno, silicio, fósforo, germanio, etc. Se admiten dos subgrupos, uno de débil mineralización (menos de 0.2 g/L) y otro de mediana mineralización (0.2-1 g/L), pero sin considerárseles factores mineralizantes especiales. (CHILUIZA, E. 2009).

*Por la cantidad de minerales:*

- Agua termal mineral de 1-1.5 gr/L
- Agua Medio mineral de 0.2-1.0 gr/L

- Agua oligo-mineral menos de 0.2 gr/L. (MÉNDEZ, A. 2010).

*Por el origen:*

- Magmáticas: primitivas, que brotan en relación con los flines metálicos o eruptivos, con temperaturas elevadas, mayores de 50° C., tienen un caudal, composición y temperatura constante, en estas muy raramente se encuentra sales de calcio, magnesio y nitritos. (CHILUIZA, E. 2009).
- Telúricas: son aguas de filtraciones, que brotan de cualquier terreno, tienen un caudal variable según la época de lluvias y estaciones, tienen temperaturas no superiores de 50° C, poseen una ligera mineralización y su concentración es inversamente proporcional al caudal, no tiene elementos con características de emanaciones metálicas o de metaloides profundos (boro, flúor, cobre, nitrógeno, etc.) sino en presencia de oxígeno. (CHILUIZA, E. 2009).

*Según el contenido químico, acción terapéutica y compuestos sobresalientes*

Es una de las clasificaciones más completas de las aguas que abarca criterios médicos, de contenido químico y acción terapéutica, en relación a los compuestos sobresalientes. (PALADINES, A. 2011).

**Tabla 1-1.** Clasificación de las aguas minerales según el contenido químico, acción terapéutica y compuestos sobresalientes

DE ACCIÓN FISIOLÓGICA	MODALIDAD	AGUAS CORRESPONDIENTES
DIGESTIVA	Eupéptica	Acídulas, alcalinas,
		Cloruradas, sulfuradas
	Purgativa	Cloruradas (acción suave)
		Sulfurosas
		Sulfatadas
	Alterante	Bromuradas
Ioduradas		
CARDIOVASCULAR	Estimulante	Cloruradas
		sulfurosas
	Diluyente	Alcalinas (en altas dosis)
	Reconstituyente	Acídulas
Ferruginosas		
RESPIRATORIA	Sedativa	Acídulas
	Alterante	Alcalinas, ferruginosas, ioduradas y sulfurosas
URINARIA	Diluyente	Acídulas, cloruradas, sulfurosas, sulfatadas
	Estimulantes	Alcalinas
GENITAL	Estimulante	Alcalinas, sulfurosas, ferruginosas
	Emenagoga	Sulfurosas
	Específica	Ioduradas, sulfurosas, bromuradas
	modificadora	Ioduradas
	Sedante	Sulfatadas
NERVIOSA	Estimulante	Acídulas, alcalinas, sulfurosas

Fuente: PALADINES, A. 2011.

### *Según la Tonacidad*

Están basadas en los valores de la Presión Osmótica o descenso crioscópico. La presión osmótica de un agua mineral está relacionada con la cantidad de iones disueltos en milimoles (concentración molar). Las aguas que tienen una concentración molar de 303 mmol/L (milimoles por litro) poseen una presión osmótica similar a la del suero sanguíneo (aguas minerales isotónicas). Según Karakolev, (1984); clasifica las aguas minerales de la siguiente manera:

- Hipotónicas: Concentraciones < 300 mmol/L
- Isotónicas: Concentraciones = 300 mmol/L
- Hipertónicas: Concentraciones > 300 mmol/L. (FAGUNDO, J., et al. 1996).

*Sobre la base del descenso crioscópico las aguas minerales clasifican como:*

- Hipotónicas: inferior a - 0.55 °C.
- Isotónicas: entre - 0.55 y - 0.58 °C.
- Hipertónicas: superior a -0.58 °C. (ARMIJO, M., & SAN MARTÍN, J. 1994).

### *Con relación al pH*

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

- Ácidas: con pH menor de 6.8.
- Neutras: con pH entre 6.8 y 7.2.
- Alcalinas: con pH superior a 7.2. (N.C. 93-01-218., 1995)

*La Norma Cubana de Agua Mineral (NC 93-01-218:1995) divide las aguas de acuerdo a la temperatura de la siguiente manera:*

- Hipertermales:  $T < 4$  °C a la temperatura media anual (< 25 °C).
- Ortotermales:  $T = a$  a la temperatura media anual (25-28 °C).
- Hipotermales:  $T > 4$  °C a la temperatura media anual (> 29 °C). (N.C. 93-01-218., 1995)

### *Clasificación Geológica- Genética*

- Agua meteórica: agua subterránea
- Agua congénita: fuera del contacto con la atmósfera durante millones de años
- Agua metamórfica: se encuentra o se ha encontrado en contacto con rocas durante su metamorfismo
- Agua Plutónica: originada en el interior de los magmas a gran profundidad, y que actualmente se encuentra allí
- Agua juvenil: jamás ha estado en contacto con la atmósfera. (INAMHI. 2013)

Según V. A. Souline

Esta clasificación es de acuerdo a la relación existente entre la concentración de los iones Sodio, Cloro, Sulfatos y Magnesio, todos expresados en mEq/L (miliequivalentes por Litro) (INAMHI. 2013)

**Cuadro 1-1.** Clasificación Según V. A. Souline de acuerdo a la relación entre la concentración de iones Sodio, Cloro, Sulfatos y Magnesio

RELACIÓN	CLASIFICACIÓN
$r \frac{Na^+ - Cl^-}{SO_4^{2-}} < 1$	Sulfatada-sódica
$r \frac{Na^+ - Cl^-}{SO_4^{2-}} > 1$	Bicarbonatada-sódica
$r \frac{Cl^- - Na^+}{Mg^{++}} < 1$	Clorurada-magnésica
$r \frac{Cl^- - Na^+}{Mg^{++}} > 1$	Clorurada-cálcica

Fuente: INAMHI. 2013.

De acuerdo al cuadro anterior también se clasifica a las aguas por su relación iónica.

Por su relación iónica (INAMHI. 2013)

**Cuadro 2-1.** Clasificación de acuerdo a su relación iónica.

CLASIFICACION POR SU RELACION IONICA
Bicarbonatada magnésica
Bicarbonatada sódica
Bicarbonatada cálcica
Sulfatada sódica
Sulfatada cálcica
Clorurada cálcica
Clorurada sódica

Fuente: INAMHI. 2013.

Por su salinidad

Esta clasificación es de acuerdo a su conductividad eléctrica que está relacionada con la concentración de sales disueltas en agua y por ende a sólidos disueltos totales (STD). Generalmente es mayor a 1000 mg/L. (INAMHI. 2013)

**Cuadro 3-1.** Clasificación de acuerdo a su conductividad eléctrica

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

Fuente: INAMHI. 2013.

### ***1.3.3 Características Físicas de las aguas termales***

Según su origen geológico existen dos tipos de aguas termales, las magmáticas y las telúricas. Una diferencia principal entre estas es el tipo de terreno, así las magmáticas nacen de filones metálicos o eruptivos, mientras que las telúricas pueden aparecer en cualquier lugar. (MÉNDEZ, A. 2010).

También la temperatura de las aguas magmáticas son primitivas, generalmente sobrepasa los 50°C, mientras que la telúricas tienen menor temperatura, además las aguas telúricas son filtradas y tienen menos cantidad de mineralización que las aguas magmáticas. Las magmáticas tienen un caudal periódico, rítmico y constante, en estas aguas se encuentra constantemente boro, bromo, arsénico, nitrógeno y fósforo. (LLOPIS ORREGO, M. 2010).

Las aguas telúricas o llamadas también de infiltración, tienen una temperatura que rara vez alcanza los 50°C, presentan un caudal variable en dependencia de las estaciones del año, usualmente poseen sales de cal, cloruros, bicarbonatos, entre otros. (<http://www.definicionabc.com/general/terma.php>. 2007).

Una peculiaridad significativa de las aguas termales es que se encuentran ionizadas. Hay dos tipos de iones, los negativos y los positivos. Los positivos no aportan beneficios para la salud, éstos son irritantes. Por el contrario los iones negativos aportan relajamiento al cuerpo. Generalmente en las aguas termales se hallan los iones negativos, de ahí se explica los beneficios que a estas se les atribuye. (MÉNDEZ, A. 2010).

**Caudal.** Pueden alternar el caudal del Agua Minero Medicinal fenómenos naturales como:

- Movimientos sísmicos cercanos o lejanos.
- Colmatación de las vías de emergencia del agua por fenómenos derivados de su propia composición, como: acumulación de carbonato cálcico o de hidróxido férrico
- Obras públicas: zanjas o canales, túneles, Pozos, entre otros. (RODÉS, B. 2000)



**Temperatura.** De esta depende la termalidad de las aguas. Está en dependencia de la profundidad de su origen, así la presión y temperatura asciende con la profundidad y así puede hablarse de gradiente geotérmico aceptándose 3°C por cada 100 metros. (RODÉS, B. 2000).

**Densidad.** La densidad del agua pura tiene alrededor de 103 kg m<sup>-3</sup>; reduciéndose con la temperatura a partir de 5 °C. A mayor densidad del agua, mayor presión hidrostática, y por ende mayor poder de flotación. (MOURELLE, M. 2007).

**Conductividad térmica.** Tiene valores alrededor de 0.6 W m<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup> y se elevan con la temperatura. En las disoluciones acuosas electrolíticas, es dependiente del soluto; para concentraciones bajas (como es el caso de un agua mineromedicinal), la conductividad térmica se acorta de acuerdo a la disminución de la concentración. (MOURELLE, M. 2007).

**Viscosidad.** Fluctúa entre 1.8 y 0,5 cP (Centipoise), disminuyendo con la temperatura. Está directamente relacionada con los factores hidrodinámicos y los movimientos de los cuerpos dentro de un líquido. (MOURELLE, M. 2007).

**pH.** Influenciado por los gases y sales disueltas; modifica el pH las sustancias ionizables y la temperatura, este varía entre 7.2 y 7.6; las aguas calcáreas poseen valores más elevados; y las descendientes de terrenos pobres en calizas o silicatos inferiores, tienen un valor de 6. Las aguas con ácidos libres derivados de sulfuros minerales, piritas o de regiones volcánicas con presencia de ácido sulfhídrico tiene un pH de o por debajo de 4. (MOURELLE, M. 2007).

**Conductividad eléctrica.** Usada para determinar la concentración de sustancias disueltas, usadas para determinar la constancia de la composición de las aguas y el control de las plantas de aguas envasadas. (MOURELLE, M. 2007).

**Radiactividad.** Todas las aguas naturales tienen un cierto nivel de radiactividad. Comúnmente tienen valores superiores en las aguas termales. (MOURELLE, M. 2007). Como referencia se encuentran los niveles establecidos para las aguas de consumo público en la Directiva 80/778/CEE, recogidos en el Real Decreto 1138/1990, actualmente vigente, esto es: 0,1 Bq/L para la radiactividad alfa total y 1,0 Bq/L para la radiactividad beta total. (RODÉS, B. 2000)

### ***1.3.4 Composición química de las aguas termales***

Está enlazada intrínsecamente a la naturaleza geológica del sitio donde surgen, ya que en terrenos lodosos las aguas pueden poseer sustancias solubles, así pueden ser el caso de metales ligeros

oxidables, sales alcalinas y alcalino térreas. Es así que estas aguas presentes en terrenos poco o nada desunidos serán muy mineralizadas y frías. Mientras q en zonas plegadas y fracturadas pueden ser termales. (SAN MIGUEL DE LA CAMARA, M. 1956).

La mineralización de las aguas termales depende de 3 factores:

- La temperatura y presión presente en el lugar donde ha tenido lugar la mineralización original
- La composición de las sustancias minerales presentes en estas
- Los gases disueltos que modifican el pH de las aguas. (SAN MIGUEL DE LA CAMARA, M. 1956).

“Agua minero medicinal corresponde a las aguas que contienen más de 1 g de materias fijas disueltas en 1000 g de agua, además de un contenido de gas carbónico y de ciertas materias raras encontradas en ella. Finalmente, estas aguas deben tener una temperatura permanentemente mayor que el promedio anual de la temperatura del lugar de la fuente” (YUPANQUI, E. 2006).

Según el contenido mineral y en base a la definición mencionada, estas aguas medicinales se dividen en dos grupos:

- Aguas medicinales mineralizadas, contienen 1 g o más de materias fijas disueltas por litro.
- Aguas medicinales oligomineralizadas o aguas medicinales mineralizadas simples, que contienen menos de 1 g de materias fijas disueltas y que se distinguen por su contenido de componentes raros farmacodinámicamente eficaces o por su temperatura elevada (YUPANQUI, E. 2006).

Todas las aguas termales contienen en mayor o menor cantidad:

- Elementos Fundamentales: Ca, Fe, Mg, K, Si, C.
- Oligoelementos: Al, Ba, Ni, Zn. (DIEPOLDER, G. 2013).

### ***1.3.5. Beneficios de las aguas termales***

El agua mineral y termal aporta diferentes beneficios al cuerpo humano. Al momento de la exposición a éstas, se puede sentir claramente la temperatura elevada que penetra por la piel. El beneficio se produce cuando ya el organismo ha absorbido una cantidad considerable de minerales, ya que estos se depositan en el tejido celular subcutáneo y es ahí cuando empieza a activar el metabolismo orgánico a través del eje hipotálamo-suprarrenal. (MÉNDEZ, A. 2010).

“La Academia de Medicina Francesa ha dado a las aguas mineromedicinales el carácter de medicamento y, como tal debe ser prescrito, vigilado y controlado por el médico. Además, la

Organización Mundial de la Salud dio en 1962 la Normativa internacional para la investigación Biomédica”. (FAGUNDO, J., et al. 1996).

**Efecto Físico.** Cuando las personas se sumergen en el agua, su cuerpo se encuentra más liviano y es así como el agua favorece los ejercicios, el entrenamiento y al mismo tiempo la temperatura actúa produciendo una dilatación en los vasos capilares reduciendo la presión sanguínea y aumentando la frecuencia cardíaca, debido a esto los músculos logran una mejor oxigenación, y por otro lado, la temperatura relaja el músculo disminuyendo su contracción. (DIEPOLDER, G. 2013).

**Efecto químico.** Por experiencias bioquímicas se demostró que ciertas sustancias penetran a través de la piel (barrera permeable) y estimulan la hipófisis, activando de esta manera la actividad de las glándulas tiroideas y de la corteza suprarrenal. Las sustancias absorbidas mediante la piel intervienen a nivel neuroendocrino liberando las endorfinas, sustancias que reducen el dolor; ayudando a la persona a disminuir la ingesta de calmantes. (DIEPOLDER, G. 2013).

### ***1.3.6. Tipo de Aguas termales y su uso***

**Aguas ferruginosas.** Poseen hierro en su composición, efectivo para disminuir estados carenciales y dolencias hepáticas, en problemas dérmicos, complemento en dietas adelgazantes. (SAN JOSÉ ARANGO, C. 2001).

**Aguas cloruradas.** Poseen cloro en su composición, estimulan las secreciones digestivas, mejora la formación de sebo y calman las irritaciones de la piel.

**Aguas sulfuradas y sulfurosas.** Poseen azufre, las sulfuradas son ácidas y lodosas, ambas son empleadas en el área de hidrología médica. Los baños de azufre pueden aliviar dolencias dermatológicas, como: La psoriasis, la dermatitis y las enfermedades por hongos. (<http://blog.hola.com/farmaciameritxell/2013/08/aguas-termales.html>. 2013).

**Aguas sulfatadas.** A más de azufre pueden tener calcio, sodio, magnesio o cloro. Se subdividen en: (MÉNDEZ, A. 2010).

- Sódicas y magnésicas, su uso es generalmente en bebida y tienen efectos laxantes.
- Sulfatadas cloruradas, se utiliza en bebida para problemas del aparato digestivo.
- Sulfatadas cálcicas y sulfatado-bicarbonatadas-cálcicas, se aplican en afecciones gástricas, intestinales y hepáticas.

En aguas termales ricas en azufre existen las sulfo-bacterias, estas son beneficiosas y mejoran el proceso de envejecimiento natural de la piel.

**Aguas bicarbonatadas.** Poseen bicarbonato, son aguas frías y alcalinas, pueden en ser sódicas, cálcicas, mixtas, cloruradas o sulfatadas. Son aguas muy empleadas en estados de acidez gástrica.

**Aguas con Flúor.** Son antisépticas. (<http://blog.hola.com/farmaciameritxell/2013/08/aguas-termales.html>. 2013).

**Aguas con Cobre.** Mejora la síntesis de colágeno, queratina y estimula los melanocitos y tiene una importante acción antiinflamatoria.

**Aguas con Zinc.** Son muy hidratantes y regeneradoras de la piel, muy eficaces frente a los problemas de acné.

**Aguas que poseen Calcio y Magnesio.** Activa la regeneración natural de la piel, protege la piel y los tejidos epiteliales.

**Aguas Radiactivas.** Recomendadas para tratar el estrés por sus efectos sedantes y para procesos alérgicos. También se usan en algunas afecciones del aparato digestivo, endocrino e inmunológico. Generalmente contienen radón un gas noble radiactivo, el nivel de radiación de estas aguas es bajo y no supone un peligro para la salud. (<http://www.balneariosenmadrid.com/aguas.html> . 2011).

### ***1.3.7. Microorganismo***

Conocido también como microbio u organismo microscópico, son aquellos seres vivos más pequeños que solamente se logran visualizar a través de un microscopio debido a que su organización biológica es elemental ya que son unicelulares. Dentro de este grupo podemos incluir a los virus, las bacterias, levaduras y mohos que pululan por el planeta tierra. (ALZAMORA, S., et al. 2004).

Algunos microorganismos son responsables del deterioro de algunos alimentos, provocando serias patologías, mientras que otros microorganismos son muy beneficios, éstos son usados en la elaboración de alimentos a fin de modificar sus propiedades o bien alargar el período de vida útil del alimento. (ALZAMORA, S., et al. 2004).

### ***1.3.8. Clases de microorganismos patógenos***

Ciertos microorganismos habitan en: Aguas naturales, dulces, estuarios, saladas y termales, los cuales se mencionan a continuación:

- Virus
- Bacterias
- Algas
- Protozoos
- Hongos microscópicos

Estos microorganismos pueden ser INDÍGENAS si son característicos de la masa de agua natural o TRANSITORIOS si se encuentran en el agua por y son procedentes de: aire, suelo, procesos industriales o domésticos. Entre éstos las Sulfobacterias son de origen hidrotermal y volcánico, además estas actúan en procesos de descomposición orgánica ya sea oxidando el H<sub>2</sub>S o bien liberando electrones para biosíntesis. (ARANGO JARAMILLO, M. 2000).

Por ello es de gran importancia la identificación de los microorganismos presentes en el agua termal ya que en las aguas destinadas para recreación con más de 2500 Coliformes/100ml, pueden aparecer infecciones de ojos, nariz, oídos y garganta. (ARANGO JARAMILLO, M. 2000).

**Microorganismos indicadores.** Son aquellos microorganismos cuya presencia indica una posible contaminación o la existencia de patógenos potenciales. (GARCÍA, M. 2006).

#### Microorganismos Indicadores tradicionales

- Bacterias Coliformes totales. Son bacterias Gram negativas, anaerobias o aerobias facultativas, no formadoras de endosporas, oxidadas negativas y que fermentan la lactosa con producción de ácido y gas en 24-48 horas a 36°C. Estas bacterias son menos persistentes que virus y protozoos. (<http://www.definicionabc.com/general/terma.php>. 2007). La presencia de este grupo de microorganismos malas condiciones de higiene y que es posible que el agua esté contaminada con patógenos, como *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus*.(ANDUEZA, Félix. 2014)
- Coliformes fecales y *Escherichia coli*. “Estas corresponden a los coliformes totales más inmediatamente relacionadas con la contaminación fecal, a más de cumplir con las características de los coliformes, desempeñan lo siguiente: Son Coliformes termotolerantes, dentro de estas están la *Klebsiella* y *Escherichia* los cuales son relacionados con la contaminación fecal. Estas bacterias tienen una adaptación a las temperaturas elevadas. Además crecen con lactosa y la fermentan a 44,5 °C produciendo ácido y gas en las primeras 48 horas de incubación.” (ALZAMORA, S., et al. 2004).

## Microorganismos indicadores alternativos

- *Clostridios sulfito- reductores*. “Continuamente se encuentran en heces de animales de sangre caliente y en aguas residuales. Es más estable en medios acuáticos naturales que la mayoría de los patógenos. Ha sido usado con éxito para monitorizar aguas contaminadas con residuos.” (ALZAMORA, S., et al. 2004).
- *Staphylococcus aureus*. Relacionadas con enfermedades no asociadas a diarrea, principalmente afecciones de mucosas muy relacionadas con el baño: conjuntivitis, otitis y problemas cutáneos. “Es estable y tiene gran resistencia a condiciones medioambientales. Su concentración en agua ha mostrado ser representativa de la carga microbiana aportada al agua por los bañistas.” (ALZAMORA, S., et al. 2004).
- *Pseudomonasa eruginosas*. “Considerada como indicador de calidad en aguas de uso recreativo ya que se encuentra asociada a infecciones relacionadas con el uso recreativo de las aguas, es más resistente que otros indicadores y microorganismos patógenos a los procesos de tratamiento del agua y a factores ambientales.” (<http://www.definicionabc.com/general/terma.php>. 2007)

**Mohos y Levaduras.** Las levaduras son organismos eucariotas más comúnmente identificadas como hongos unicelulares no filamentosos cuya forma típica es esférica u oval, al igual que los hongos se encuentran ampliamente distribuidos, frecuentemente se los halla como polvillo blanco. Las levaduras en su mayoría forman colonias de organismos unicelulares, los mismos que crecen a medida que aumenta el número de levaduras generalmente por gemación.

Hongos dimórficos, el dimorfismo es una respuesta a las variaciones de temperatura, estos pueden crecer como moho o levadura, presentan forma micelial a 25 °C y de levadura a 37 °C. (SANTAMARÍA, M., et al. 1997).

**Bacterias aerobias mesófilas o heterótrofa.** Su presencia en numerosas cantidades demuestra problemas de higiene y contaminación del agua. (ANDUEZA, Félix. 2014)

**Enterococos.** Grupo de bacterias Gram (-) simbolizadas por el grupo de Enterococos fecales que indican contaminación fecal. (ANDUEZA, Félix. 2014)

**Hipertermófilos.** “Se conocen como hipertermófilos a aquellos microorganismos que crecen por encima de 80°C. Hay algunos que crecen por encima de la temperatura de ebullición del agua como en el caso de *Pyrolobus fumarii* cuyo hábitat que resiste hasta 113°C, muchos de ellos pertenecen al grupo de las Archaeas (Arqueas) que suelen vivir en ambientes extremos de T, pH, salinidad. Los hipertermófilos se encuentran en entornos terrestres o marinos, siempre que haya agua Caliente, agua calentada por fuentes termales, geisers o volcanes.” (SINIESTERRA, J. 1998).

### 1.3.9. Microbiología

“Ciencia que estudia a los seres vivos no visibles al ojo desnudo, requiriendo el uso de microscopios, aunque se incluyen también metazoos parásitos, no microscópicos. Estos seres vivos en la naturaleza pueden ser de vida libre, desenvolviéndose como saprofitos o predadores, o mantienen una relación estable con otros organismos vivos con distinto grado de simbiosis (comensalismo, mutualismo, parasitismo).” (GARCÍA, J., & PICAZO, J. 1999). Estos parásitos pueden estar presentes en las aguas termales incluso a temperatura de 85°C, así como también en las profundidades oceánicas.

**Microbiología Sanitaria.** “Estudia a los microorganismos de interés en el agua y alimentos, así como los factores ecológicos que determinan su sobrevivencia, crecimiento e inactivación.” (ZÚÑIGA, A., et al. 2006).

**Microbiología de las aguas termales.** Las aguas minero-medicinales en su emergencia tienen una población microbiológica adaptada a las características del agua: temperatura, nutrientes, oxigenación, pH, etc. No son en absoluto aguas estériles ni siquiera las que surgen a muy elevada temperatura. (RODÉS, B. 2000)

Uno de los problemas que pueden conllevar graves consecuencias es la contaminación del agua mineral por microorganismos Alóctonos procedentes de las capas superiores del suelo, de donde son vehiculados por las aguas de infiltración que se mezclan con el agua de origen profundo o incluso pueden llegar al propio acuífero.

Las bacterias que pueden contaminar el agua minero-medicinal son los coliformes, los estreptococos, los clostridios, que se consideran indicadores de falta de protección de la surgencia o de la captación del agua y más grave sería la presencia de *Escherichia coli* o *Salmonella* que suponen un claro riesgo sanitario pues son gérmenes patógenos, así como *Pseudomonas aeruginosa*. (RODÉS, B. 2000)

Estudios microbiológicos

- Demostración de ausencia de parásitos y de microorganismos patógenos.
- Recuento total de microorganismos revivificables, indicativos de contaminación fecal:
  - ✓ Ausencia de “*Escherichia coli*” y otros coliformes en 250 mililitros a 37°C y 44,5°C.
  - ✓ Ausencia de estreptococos fecales en 250 mL.
  - ✓ Ausencia de *Clostridios sulfito reductores* en 50 mL.

- ✓ Ausencia de *Pseudomonas aeruginosa* en 250 mL.
- Recuento total de microorganismos revivificables por mililitro de agua:
  - ✓ Incubados entre 20°C y 22°C durante 72 horas en placas de agar o mezcla de agar gelatina.
  - ✓ Incubados a 37°C durante 24 horas en placas de agar. (Real Decreto 1074/2002, de 18 de Octubre, por el que se regula el proceso de elaboración, circulación y comercio de aguas de bebida envasadas) (RODÉS, B. 2000)

**Legionella.** Un nuevo motivo de preocupación ha venido recientemente a obligar a establecer controles periódicos y en consecuencia acciones preventivas y correctoras. Se trata de la presencia del microorganismo *Legionella pneumophyla*. No cabe pues ninguna duda acerca de la necesidad de controlar la posible aparición de esta bacteria en las instalaciones de toda estación termal. La investigación de la posible presencia de *Legionella pneumophila*, debería llevarse a cabo con periodicidad mensual o, como mínimo, bimensual, alternando los puntos de toma de muestra, tanto los de tratamiento (RODÉS, B. 2000)

### **1.3.10 Características microbiológicas del agua mineromedicinal**

Las aguas termales ostentan ecosistemas muy extremos en los que a pesar de tener elevadas temperaturas constituyen en un ambiente propicio para muchos organismos vivientes. Generalmente se encuentran microorganismos autóctonos propios de cada agua, pero a más de ello pueden encontrarse microorganismos alóctonos, que son nativos de otros entornos y que se los considera como contaminantes y que cohabitan con los autóctonos. (DE LA ROSA, J., & MOSSO, M. 2000).

#### Microorganismos autóctonos

Generalmente se ha encontrado escasa diversidad microbiana en aguas de manantial con pH alcalino como son *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Exiguobacterium*. En ambientes con pH ácido se han reportado cifras pequeñas de bacterias especialmente Gram (+) irregulares. En las mesotermiales predominan los bacilos Gram negativos y los cocos Gram positivos. Mientras que en las aguas termominerales las Gram (+) son mayormente registradas, los principales géneros identificados han sido: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Enterobacter*, *Acinetobacter* y *Arthrobacter*. (MOSSO. 1994).

Ampliamente inmersas en estas aguas están las especies del género *Bacillus* los mismos que pueden ser procedentes de otros entornos como el suelo o de las mismas aguas. Los cocos Gram positivos, *Staphylococcus* y *Micrococcus* debido a su gran resistencia a elevadas concentraciones de sal, se



hallan a menudo en aguas minerales. Los bacilos Gram positivos irregulares como *Arthobacter*, *Kurthia*, *Corynebacterium*, *Cellulomonas*, *Exiguobacterium*, *Rubrobacter* se localizan generalmente en aguas hipertermales o carbónicas. (DE LA ROSA, J., & MOSSO, M. 2000).

Otro género considerado como parte de la micropoblación autóctona debido a su amplia distribución en estos ecosistemas es el género *Enterobacter*, a pesar de su pertenencia a la familia enterobacteriaceas. (DE LA ROSA, J., & MOSSO, M. 2000).

### Microorganismos Alóctonos

En este tipo de agua no existen bacterias patógenas ni indicadores fecales, pero algunos de los registrados son coliformes, enterococos, *Clostridium sulfito reductores* y *Pseudomonas aeruginosa*. Cabe mencionar que los microorganismos halófilos moderados habitan manantiales hipertónicos y existe mayor proporción de bacterias anaerobias facultativas que aerobias estrictas en manantiales carbónicos. (DE LA ROSA, J., & MOSSO, M. 2000).

Usualmente la mayoría de bacterias son mesófilas, lo que indica que su crecimiento óptimo es 37°C, pero como siempre existen bacterias que no se acoplan a ese ambiente y crecen en hábitats de hasta 45°C, pero todo esto está en dependencia de las propiedades fisicoquímicas de cada tipo de agua como: pH, temperatura, nutrientes, densidad, dureza, conductividad, entre otras. No todos los organismos presentes necesariamente tienen que ser parte de la microbiota propia de dicho manantial, sino que podrían ser alóctonos (provenientes de otros hábitats como suelo, heces, etc.) identificados como contaminantes pero que se han adaptado a las condiciones adversas. Algunos de los microorganismos considerados de gran interés sanitario corresponden a *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Legionella*. (DE LA ROSA, J., & MOSSO, M. 2000).

Para realizar un estudio de estos es necesario utilizar varios indicadores siendo *Escherichia coli* el más significativo. La coincidencia de *P. aeruginosa* (patógeno oportunista) en estos manantiales puede producir infecciones en personas inmunodeprimidas, esta casualidad podría reflejar una inadecuada protección de estas aguas no transmitidas por el hombre (LECLERC & MOSSEL. 1989).

### 1.3.11 Otros microorganismos

***Moraxella***. El género *Moraxella* es miembro de la familia *Moraxellaceae*; en su mayor parte son inmóviles en líquido, son Gram negativas con forma de bacilo corto, cocobacilares distribuidas por lo general en cadenas cortas o pares (diplococos), La mayoría de las especies son aeróbicos, y oxidasa y catalasa positiva. Crecen adecuadamente en Agar sangre a 37 °C con pH de 7,3 - 7,5; se

observa alrededor de la colonia una zona estrecha de beta hemólisis, entre las 24 y 48 horas de incubación, las colonias en el agar sangre con son pigmentadas, son redondeadas, translúcidas, gris blanquecina y a medida que el medio envejece el centro de la colonia se eleva. En los caldos de cultivo crece con ligero enturbiamiento y con formación de un grueso sedimento. (MCGREGOR, K. 1998)

**Ralstonia.** Es un género de proteobacterias previamente incluido en el género *Pseudomonas*. Son, bacilos Gram-negativas, no fermentadores, causantes de infecciones nosocomiales. Considerados patógenos oportunistas emergentes como *Pseudomonas aeruginosa* o *Staphylococcus aureus*, se aprovechan de las condiciones y enfermedades subyacentes. *Ralstonia pickettii*, se supone de importancia clínica mínimo; sin embargo, se han registrado casos de infecciones que pueden incluir bacteriemia/septicemia causada por soluciones contaminadas, como agua destilada, agua para soluciones acuosas de clorhexidina y de inyección, además otros casos de infecciones inusuales, invasivas y graves, como meningitis, artritis séptica y osteomielitis. (RYAN., et al. 2005)

**Methylobacterium.** Pertenece a la Proteobacteria  $\alpha$  y cuenta con más de 34 especies descritas. Caracterizado por oxidar la glucosa o ser inerte, no crecer en Mc Conkey, ser oxidasa positiva y móvil. Degradan compuestos de un carbono tales como metanol y metilamina, se encuentran considerablemente distribuidos en el medio ambiente, en suelo, agua, superficie de las hojas, los nódulos, las semillas, el aire y los sedimentos. Se ha demostrado interactuar simbióticamente con diferentes especies de plantas de importancia agronómica, así en la caña de azúcar, *Methylobacterium* spp. Está dentro de la planta y se presume el responsable del aumento de la germinación de semillas, área foliar, altura de planta y número de entrenudos. (BRAZ, J. 2011)

Un estudio realizado en humanos señala una sola especie: *M. mesophilicum*. En la que se visualiza en muestras clínicas de pacientes inmunodeprimidos, siendo reportado como causa de bacteriemia y peritonitis. Se ha cultivado en sangre de pacientes con trasplante de médula ósea. (GARCÍA, B. s.f.)

**Bacillus.** Bacterias Gram positivas, aerobia o anaeróbicas en forma de bastoncillos, distribuidos ampliamente en suelo y agua, la mayoría positivas a la prueba de la catalasa, son saprofíticas, generalmente móviles. Según Ferdinand Cohn quien aportó una descripción fehaciente de dos formas diferentes de bacilo del heno (*Bacillus subtilis*): uno sensible y uno resistente a la exposición del calor, llamó a las formas resistentes "esporas". Actualmente se conoce que todas las especies de *Bacillus* pueden formar esporas latentes en condiciones ambientales adversas.

Algunos tipos de bacterias *Bacillus* son nocivos para los seres humanos, plantas u otros organismos. Como en el caso del *B. cereus* causante del deterioro en los alimentos enlatados y la intoxicación alimentaria de corta duración; el *B. subtilis* un contaminante común de cultivos de laboratorio y a menudo se encuentra en la piel humana. La mayoría de las cepas de *Bacillus* no son patógenas para los seres humanos, pero pueden, como los organismos del suelo, infectar a los humanos por cierto. Una excepción notable es *B. anthracis*, que causa ántrax en los seres humanos y animales domésticos. *B. thuringiensis* produce una toxina (toxina Bt) que causa la enfermedad en los insectos. (MANSUR, G., et al. 2014).

### 1.3.12. Recuento de microorganismos

Constituye un procedimiento que permite saber el número de microorganismos que están presentes en una muestra. Existen varios métodos para el conteo de microorganismos vivos, mediante el recuento de viables; o bien vivos y muertos mediante el recuento de totales.

También se clasifican en directos e indirectos. Es directo cuando se cuentan las células por observación directa al microscopio, e indirecto cuando se determina por el crecimiento o característica de los microorganismos. (PASCUAL ANDERSON, M., et al. 2000).

**Cuadro 4-1.** Criterios de calidad para piscinas con aguas termales

CRITERIOS DE CALIDAD PARA PISCINAS CON AGUAS TERMALES		
INDICADOR	PROMEDIO GEOMETRICO 100 mL.	TURBIEDAD UNT
Coliformes termorresistentes	240	20
Clostridium perfringes	100	20

**NOTAS:**

- Muestreo, técnicas de laboratorio igual a piscinas normales.
- Las aguas deben circular o ser filtradas permanentemente.

Fuente: MORA, Darner. 1989. p 29.

### 1.3.13. Aguas Termales de Aguallanchí o Guayllabamba

Situadas en la provincia de Chimborazo a 12 km de la ciudad de Riobamba, y a 7 km del cantón Chambo, en el límite entre las comunidades de Guayllabamba y San Francisco, a una altitud de 3 240 m.s.n.m (metros sobre el nivel del mar) y a 12°C de temperatura. Es una fuente de agua termal de origen volcánico rica en sulfuro, con poderes curativos. (AME. 2012).

**Cuadro 5-1.** Análisis realizados por el INAMHI en las Aguas Termales de Guayllabamba

FECHA	LOCALIDAD	H. TOPOGR	pH	CE ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	STD	T° (C)	USO	TIPO
7/21/12	Palictagua	Palictagua	6.99	3000	1920	40	Sin Uso	V. Hipertermal
7/21/12	Los Elenes	Guano	7.75	1938	1240	22.7	Recreación	V. Hipotermal
7/21/12	Guayllabamba	Riobamaba	6.5	1359	870	40	Recreación	V. Hipertermal
7/22/12	Palmira	Palmira	8.07	382	244	14.8	Recreación	V. Fria

Fuente: INAMHI. 2013.

## CAPITULO II

### 2. MARCO METODOLOGICO

<b>Materiales y Equipos</b>	<b>Reactivos</b>
Lámpara de Alcohol	Agar Mueller Hinton
Asa de platino	Agar Eosina
Cajas Petri	Agar Almidón
Palillos	Agar Gelatina
Placas Petrifilm para Recuento de Aerobios, <i>E. coli</i> <i>/ coliformes</i> , Staph Express, Mohos y Levaduras	Tirilla de Oxidasa Peróxido de Hidrógeno al 3%
Marcador y Parafilm	Agar F(medio King B)
Regla y Libreta	Medio de Hugh-Leifson
Tubos de ensayo	Agar citrato de Simmons
Microscopio	Agar urea
Cámara de Flujo	Agar Kligler
Autoclave	Agar SIM
Estufa	Agua destilada
Pipetas	Cristal violeta
Matraz Erlenmeyer	Lugol
Reverbero	Acetona
pH metro	Safranina
placas porta objetos	Aceite de inmersión

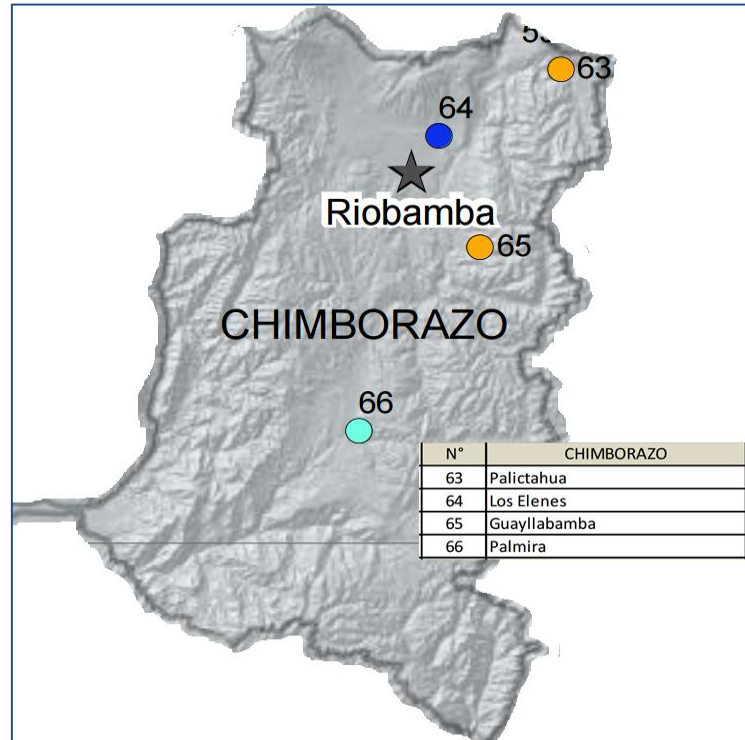
### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1 Características del lugar

**Localización.** El presente estudio se llevó a cabo en las Aguas termales de Guayllabamba a 7 km del cantón Chambo, provincia de Chimborazo, en el límite entre las comunidades de Guayllabamba y San Francisco a una altitud de 3 400 msnm y una temperatura de 12°C. Es una fuente de agua

termal de origen volcánico rica en sulfuro, a la que se le atribuyen poderes curativos, Aun lado de fuente termal cruza el río Timbul.

**Figura 1-2.** Ubicación de las Aguas termales de Guayllabamba



**Realizado por:** Vanesa Veintimilla

**Fuente:** INAMHI. 2013

Se ubica noroeste de la provincia de Chimborazo, a 12 Km de la ciudad de Riobamba, delimitada por las coordenadas en UTM enunciadas en la siguiente tabla

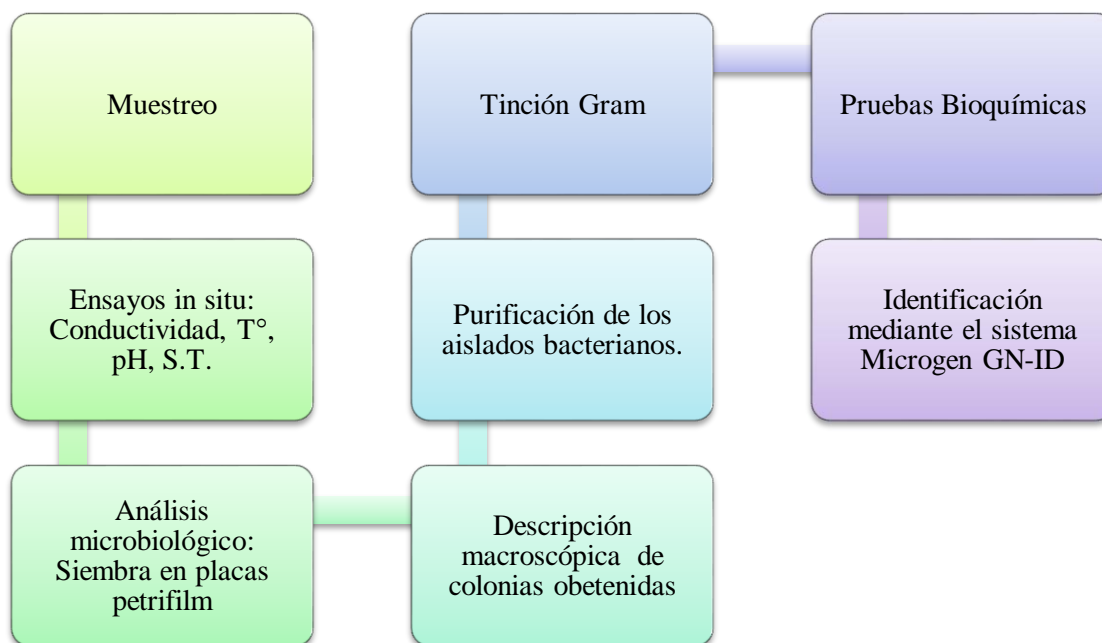
**Tabla 2-2.** Ubicación geográfica de las Aguas termales de Guayllabamba

Ubicación geográfica	Coordenadas UTM (m)
<b>Latitud</b>	1°47'28'' S
<b>Longitud</b>	78°32'47'' O
<b>Altitud (msnm)</b>	3 400

**Realizado por:** Vanesa Veintimilla

### 3.2 Diseño de investigación

**Figura 2-2.** Representación esquemática del procedimiento



Realizado por: Vanesa Veintimilla

### 3.3 Unidad de análisis

Mililitros de agua mineral procedente de las aguas termales de Guayllabamba

### 3.4 Población de estudio

La unidad experimental y población en este estudio fueron las aguas termales de Guayllabamba del Cantón Chambo, provincia de Chimborazo. En este lugar se tomaron dos muestras de agua, la primera del ojo de agua ubicado cerca de la estatua de San Francisco y la segunda del ojo de agua cercana a la cañería que conecta a la segunda piscina.

**Figura 3-2.** Sitios donde se muestreó del agua termal de Guayllabamba



Realizado por: Vanesa Veintimilla

### 3.5 Muestreo

Previamente a la toma de muestra es necesario llevar un aseo adecuado de manos, brazos y antebrazos, al igual que el uso de vestimenta apropiada de protección, seguidamente se procedió a tomar la muestra siempre en contracorriente, se tapó herméticamente el frasco que contiene la muestra de agua; y posteriormente se procedió de acuerdo a lo especificado en las normas para muestreo NTE INEN 2176:2013 y para manejo y conservación de muestras NTE INEN 2169:2013

Según la norma NTE INEN 2176:2013 Debe incluirse al menos los siguientes datos en el informe de muestreo:

- Localización y nombre del sitio de muestreo
- Detalles del punto de muestreo
- Fecha de la recolección
- Método de recolección



- Hora de la recolección
- Nombre del recolector
- Condiciones atmosféricas
- Naturaleza del pretratamiento
- Preservante o estabilizador adicionado
- Datos recogidos en el campo

### 3.6 Ensayos fisicoquímicos “in situ”

Este paso se efectuó en el manantial (in situ) con la debida asepsia y precaución, siguiendo el protocolo correspondiente, posteriormente con ayuda del equipo multiparámetro de marca HANNA, se examinó la muestra y se tomó la lectura de cada parámetro: Conductividad medida en  $\mu\text{S/cm}$ , Temperatura medida en  $^{\circ}\text{C}$ , pH reportado sin unidades, y Solidos totales Disueltos medidos en ppm.

### 3.7 Análisis microbiológico

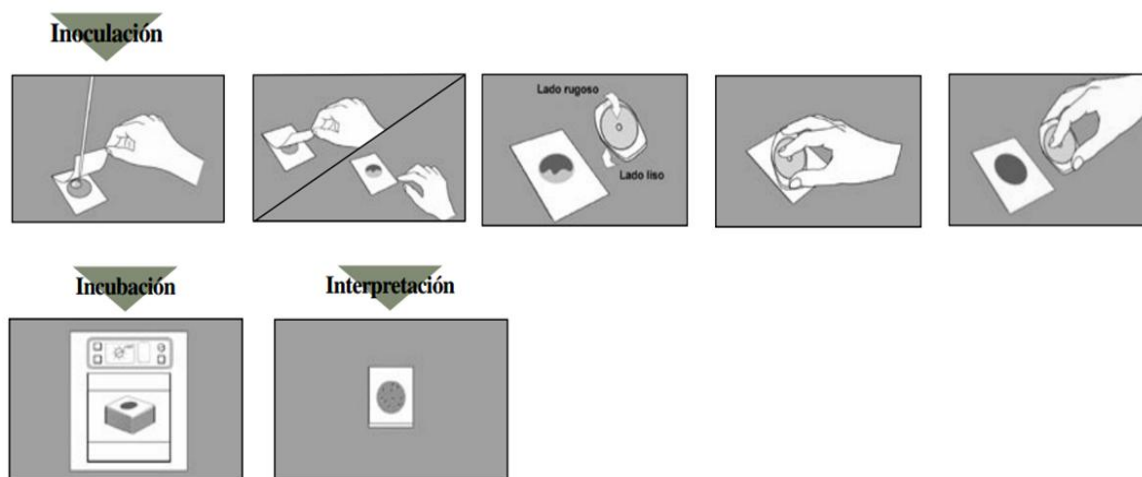
**Cuantificación de bacterias Aerobios mesófilas.** Se levantó la lámina transparente, se colocó 1 mL de muestra de agua en el centro sin tocar el medio (film inferior) y se dejó caer el film superior. Con el lado rugoso hacia abajo, se colocó el dispensor sobre la película superior, presionando suavemente hasta distribuir totalmente la muestra y retirarlo. Se incubó la placa Petrifilm cara arriba a  $30^{\circ}\text{C}$  durante 72 horas. Posterior a este tiempo se procedió al conteo de las colonias y se reportó los resultados como UFC/mL (unidades formadoras de colonias por mililitro). (3M, 2003)

**Enumeración de la cantidad de Coliformes totales y fecales.** Se levantó la lámina transparente y se agregó 1 mL de muestra de agua en el centro del medio, sin tocarlo y soltar el film superior. Se colocó el dispensor sobre la película superior, presionando suavemente hasta distribuir totalmente la muestra. Se incubó la placa Petrifilm cara arriba a  $35^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas. Se procedió al conteo de las colonias y se reportó los resultados como UFC/mL. (3M, 2003)

**Detección de bacterias del género *Staphylococcus*.** Se levantó la lámina transparente y se colocó 1 mL de muestra de agua en el centro del medio sin tocarlo, luego dejar caer el film superior. Se colocó el dispensor sobre la película superior del Petrifilm, presionando suavemente hasta distribuir totalmente la muestra y se lo retiró. Se incubó la placa cara arriba a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas una sobre otra en grupos de no más de 20 placas. Culminado este período se procedió al conteo de las colonias y se reportó como UFC/mL. (3M, 2003)

**Valoración de Mohos y levaduras.** Se alzó la lámina transparente y se ubicó 1 mL de muestra de agua en el centro del medio, y se dejó caer el film superior. Se colocó el dispensador sobre la película superior, presionando suavemente hasta distribuir totalmente la muestra. Se incubó la placa Petrifilm cara arriba a 25°C durante 3-5 días y se procedió al conteo de las colonias reportándose como UFC/mL. (3M, 2003)

**Figura 4-2.** Ilustración gráfica de la Siembra en placas Petrifilm



Fuente: 3M, 2003

### 3.8 Descripción macroscópica de colonias

Transcurrido el período de incubación, se observó las placas Petrifilm en contra luz. Luego se comparó e identificó la forma de las colonias según sus características morfológicas: redondeada, irregular, etc. Se observó el color de cada colonia, la luz transmitida (opaca, translúcida, transparente) y reflejada (opaca, brillante) a través de cada colonia, su consistencia: membranosa o cremosa, sus bordes: pudiendo ser ondulado, entero o filamentoso, el tipo de superficie: lisa, rugosa, plegada. (MACFADDIN, 2004)

### 3.9. Purificación de los aislados bacterianos

#### a. Preparación de Agar Mueller Hinton

En un Erlenmeyer se disolvió una cantidad de Agar en agua suficiente de acuerdo a cálculos previos, según la cantidad de cajas a utilizar. Se sometió al fuego hasta que soltó hervor agitando constantemente, realizar tres ebulliciones para disolver completamente el Agar. Una vez disuelto se esterilizó a 121°C durante 15 minutos, luego se enfrió a 45°-50°C y se repartió uniformemente en

cajas Petri estériles, en volumen apropiado para que el espesor sea de 4 mm sobre una superficie horizontal de la caja. (PERILLA, M., et al. 2003)

#### b. Aislado bacteriano

Para separar un microorganismo del resto, se tomó con palillo estéril una colonia de la placa Petrifilm q se desee aislar y se inoculó sobre el medio de cultivo realizando un solo toque, de modo que al final cada bacteria quedó separada e inmovilizada una a lado de otra, se incubó a 37°C durante 24-48 horas. Se realizó tres aislamientos dando como derivación colonias aisladas, cada una con determinadas características macroscópicas, a partir de las cuales se obtuvieron un cultivo puro de cada tipo de bacteria.

#### c. Obtención de cultivos puros

Para conseguir bacterias puras en un medio de cultivo, se tomó pequeña cantidad de masa bacteriana de una colonia separada en el aislamiento y se inoculó un nuevo medio realizando estrías muy unidas. Se procedió a incubar en condiciones adecuadas a 37°C durante 24-48 horas lo cual proporcionó un cultivo puro. Este proceso se repitió con cada tipo de colonia bacteriana y así se obtuvieron los cultivos puros y separados de los microorganismos procedentes de la muestra original.

### **3.10. Pruebas bioquímicas y fisiológicas realizadas a las colonias aisladas y purificadas**

#### ***3.10.1 Tinción de Gram***

Se colocó una gota de solución salina en una placa porta objetos limpia, con ayuda del asa estéril se seleccionó unas cuantas colonias y se las suspendió en la gota de solución salina, se extendió la gota y la muestra de colonias sobre la placa porta, se realizó la fijación de la muestra con ayuda del calor, exponiendo a la llama suavemente (flamear aproximadamente 3 veces). Luego se cubrió la placa con cristal violeta y luego de 1 minuto se enjuagó con agua destilada, se agregó Yodo-Lugol y al cabo de 1 minuto se enjuagó con agua destilada, se agregó alcohol-cetona y luego de 30 segundos se enjuagó, finalmente se colocó safranina, se esperó 1 minuto y se enjuagó. Por último se secó la muestra y se observó en el microscopio con el objetivo de inmersión (100x). (RODRÍGUEZ CAVALLINI, &FORBES, B. 2009)

### **3.10.2. Pruebas Bioquímicas**

#### **Catalasa.**

La prueba de la catalasa es usada para distinguir miembros de la familia *Micrococaceae* de miembros de la familia *Streptococcaceae*.

#### Procedimiento

- Se agregó 1 gota de Peróxido de Hidrógeno al 3% sobre una placa porta objetos limpia
- Con un palillo se tomó un poco de muestra de una colonia y se la transfirió a la placa
- Se observó si existe una producción rápida y sostenida de burbujas o efervescencia, lo cual indica resultado positiva. (BEJAR, V., et al. 2015)

#### **Citocromo-oxidasa.**

Esta prueba es importante para identificar aquellos organismos que carecen de esta enzima (anaerobios obligados). Es una prueba útil para diferencia Enterobacterias (Todas Oxidasa negativas) de otras especies como *Pseudomona* o *Neisserias* oxidasa positiva.

#### Procedimiento

- Se tomó con un palillo de madera un poco de muestra de la colonia y se colocó sobre una tirilla de Oxidasa que contiene el reactivo
- Al cabo de unos 30 segundos se leyó el resultado, si la tirilla tomó un color azul intenso en el sitio de la prueba es resultado positiva. (BEJAR, V., et al. 2015)

#### **Prueba de oxidación y fermentación (OF).**

Se usa esta prueba para indicar del tipo de metabolismo energético: respiratorio (O) o fermentador (F), utilizándose como sustrato la glucosa.

#### Procedimiento

- Se tomaron dos tubos de ensayo, y con la ayuda de una asa recta estéril se cogió un poco de muestra de una colonia aislada
- Se inocularon ambos tubos por el método de picadura (se inocularon con el hilo recto)
- El primer tubo se lo tapó suavemente a fin de permitir el ingreso de oxígeno
- Al segundo tubo se agregó 1.5-2ml de aceite mineral estéril y se lo tapó completamente
- Ambos tubos se incubaron durante 24 horas y posterior a ello se leyó el resultado

- Si Ambos tubos no cambiaron de color se reportó: Inerte. Si ambos tubos cambiaron a amarillo se reportó: Fermentador facultativo. Si el primer tubo sin aceite fue amarillo y otro con aceite fue verde se reportó como: oxidativa. (BEJAR, V., et al. 2015)

### **Citrato.**

Este medio es importante para identificar muchos miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, en base a la capacidad de usar citrato como única fuente de carbono y energía.

#### Procedimiento

- Se preparó agar citrato de Simmons de acuerdo a las indicaciones del fabricante
- Con la ayuda de una asa recta estéril se tomó un poco de muestra de una colonia aislada
- Se inoculó en el tubo que contenía el agar mediante la siembra primero por picadura y luego en estría en la superficie inclinada.
- Se incubó a 37 grados °C durante 24 horas
- Finalmente se leyó el resultado: Si cambió a un color azul intenso es resultado positiva. (BEJAR, V., et al. 2015)

### **Urea.**

Esta prueba es útil para la identificación de microorganismos, en base a la capacidad de hidrolizar la urea con la producción de amoníaco, permite diferenciar *Proteus spp.*, de otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae*.

#### Procedimiento

- Se preparó agar urea de acuerdo a las indicaciones del fabricante
- Con la ayuda de una asa recta estéril se tomó un poco de muestra de una colonia aislada
- Se inoculo en el tubo que contiene el agar mediante la siembra primero por picadura y luego en estría en la superficie inclinada.
- Se incubó a 37 grados °C durante 24 horas
- Se leyó el resultado: Si cambió a color Rojo fucsia es positivo. (BEJAR, V., et al. 2015)

### **SIM(Sulfuro-Indol-Motilidad).**

Esta prueba se basa en la formación de un complejo rojo cuando el Indol reacciona con el grupo aldehído p-dimetilaminobenzaldehído.

#### Procedimiento

- Se preparó el medio SIM de acuerdo a las indicaciones del fabricante
- Con la ayuda de una asa recta estéril se tomó un poco de muestra de una colonia aislada

- Se inoculó el tubo que contiene el medio por el método de picadura(se inocula con el hilo recto), hasta la mitad del medio
- Se incubó a 37 grados °C durante 24 horas
- Se adicionó 5 gotas del reactivo de Kovacs por la pared del tubo.
- Se leyó el resultado: Si se formó un anillo rojo-fucsia es positivo.(BEJAR, V., et al. 2015)

### **Kligler.**

Esta prueba permite pronosticar del tipo de Enterobacteria aislado. Las enterobacterias más patógenas no suelen fermentar (producir ácidos) la lactosa.

#### Procedimiento

- Se preparó agar urea de acuerdo a las indicaciones del fabricante
- Con la ayuda de una asa recta estéril se tomó un poco de muestra de una colonia aislada
- Se inoculó el tubo que contiene el agar mediante la siembra primero por picadura y luego en estría en la superficie inclinada.
- Se incubó a 37 grados °C durante 24 horas
- Y se leyó el resultado según la producción de ácidos, como se muestra en la **Tabla 3-2.** (BEJAR, V., et al. 2015)

**Tabla 3-2.** Prueba Kligler. Producción de ácidos:

<b>Posibles resultados</b>	<b>Lactosa</b>	<b>Glucosa</b>	<b>Interpretación</b>
Todo el cultivo amarillo	+	+	ácida/ácida
Amarillo en el fondo y rosa en el pico de flauta	-	+	alcalino/ácido
Todo el cultivo rojo o rosa	-	-	alcalino/alcalino
Precipitado negro			Producción de SH <sub>2</sub>
Fractura o desplazamiento del medio			Producción de gas

Fuente: BEJAR, V., et al. 2015.

### **3.11 Identificación de microorganismos por el sistema de Microgen**

El sistema Microgen GN-ID utiliza 12 (GN A) o 24 (GN A+B) substratos bioquímicos estandarizados en pocillos para identificar la familia Enterobacteriaceae y otros bacilos no exigentes Gram negativos (oxidasa negativos y positivos).

El sistema Microgen GN-ID comprende dos tiras de micropocillos por separado (GN A y GN B). Cada tira contiene 12 substratos bioquímicos estandarizados que han sido seleccionados en función de un análisis informático exhaustivo de las bases de datos publicadas para la caracterización de la

familia Enterobacteriaceae y los microorganismos Gram negativos oxidasa positiva y negativa no-exigentes más comunes. En cada pocillo se encuentran substratos los cuales son reconstituidos con una suspensión salina del organismo a identificar; si presenta un cambio de color durante la incubación o después de la adición de reactivos específicos indica que los substratos son metabolizados por el organismo. La permutación de los substratos metabolizados se puede interpretar usando el Software Microgen Identification (MID-60) para identificar el organismo analizado. Las tiras de GN A han sido creadas para la identificación de fermentadores de glucosa oxidasa negativos, nitrato positivas que incluyen los géneros más comunes de la familia Enterobacteriaceae. Las tiras GN A y GN B se utilizarán conjuntamente obteniendo un sistema con 24 substratos para identificar bacilos Gram negativos no-exigentes (oxidasa negativos y positivos) además de todas las especies de la familia Enterobacteriaceae (28 géneros). Las tiras de GN B han sido diseñadas para ser usadas conjuntamente con las tiras GN A y no de modo individual. (MICROGENTM GN-ID IDENTIFICACIÓN. 2004)

Es importante observar si presenta un círculo Negro alrededor del extremo superior del pocillo significa que requiere la adición de aceite mineral antes de la incubación, mientras que un círculo verde alrededor del extremo superior del pocillo indica que el pocillo requiere la adición de reactivos después de la incubación. (MICROGENTM GN-ID IDENTIFICACIÓN. 2004)

**Figura 5-2.** Interpretación de colores posterior a la incubación del Microgen y adición de reactivos específicos.

**Colour chart/Farbtafel/Tableau 'de couleurs**

**Microgen™ GN A ID**

WELL/NAPFCHEN /GODET	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	7
Reaction	Lysine	Ornithine	H <sub>2</sub> S	Glucose	Mannitol	Xylose	O.N.P.G.	Indole	Urease	V.P.	Citrate	T.D.A.	Nitrate
Negative													
Positive													

**Microgen™ GN B ID**

WELL/NAPFCHEN /GODET	13								Adonitol	Raffinose	Salicin	Arginine 24hrs	Arginine 48hrs
Negative													
Positive													

CAUTION: Keep out of direct sunlight. Due to laminate discolouration and paper ageing, the colours on this chart will change.  
These colours are provided as general guide to the range of test colours.

Legend:  
 Appropriate reagents to be added prior to reading.  
 Overlaid with sterile mineral oil.  
 Not overlaid with oil for oxidase positive organism.

Fuente: MICROGENTM GN-ID IDENTIFICACIÓN. 2004.

- Se hizo un test oxidasa de la bacteria aislada, las oxidasa positivas se identificaron inoculando tanto las tiras del GN A como GN B.
- Se emulsificó una única colonia obtenida del cultivo de 24 horas en 3 mL de solución salina estéril 0.85% para la tira GN A. Si se inocularon ambas tiras, GN A y GN B, la colonia se emulsificó en 3-5mL de solución salina estéril 0.85% y se mezcló bien.
- Se retiró cuidadosamente la laminilla adherente que cubre los pocillos y se dejó a un extremo.
- Se colocó con una pipeta pasteur estéril 100µL de la suspensión bacteriana a cada pocillo de la tira(s).
- Posteriormente de la inoculación, se revistió los pocillos 1,2 y 3 (numerar la tira GN A empezando por el final de la etiqueta) y pocillos 20 y 24 (tira GN B – el pocillo 13 es al final de la etiqueta) con 3-4 gotas de aceite mineral. (NO agregar 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.
- Se selló la tira(s) con la laminilla adherente que se había retirado e incubó a 35-37°C. Asegurarse que los “agujeros” de la cinta adhesiva están sobre los pocillos 7, 11 y 12 en la tira GN A strip y sobre el pocillo 14 en la tira GN B.
- Las tiras GN A y GN B se leyeron luego de 18-24 horas de incubación para las Enterobacteriaceae, y después de 48 horas para los aislados oxidasa positivos. (MICROGENTM GN-ID IDENTIFICACIÓN. 2004)

### ***3.11.1. Lectura y adición de reactivos***

#### Tira GN A

- Se retiró la laminilla adherente y se apuntó todas las reacciones positivas con la ayuda de la carta de color que viene con el test, además se registró los resultados en la hoja de resultados proporcionada.
- Se adicionó los reactivos apropiados a los siguientes micropocillos:
  - ✓ Se adicionó 2 gotas de reactivo Kovac's al pocillo 8 y se anotó el resultado después de 60 segundos. Es positivo si se produce un color rojo
  - ✓ Se adicionó 1 gota del reactivo VP I y 1 gota de VP II al pocillo 10, se leyó el resultado luego de 15-30 minutos. Es positivo si se produce un color rosa / rojo
  - ✓ Se adicionó 1 gota del reactivo TDA al pocillo 12, se observó después de 60 segundos. Es positivo si se produce un color rojo cereza
- Se hizo el test de reducción de nitrato al pocillo 7 después de leer y anotar el resultado del test ONPG (coloración del pocillo sin añadir nada). Se añadió al pocillo 1 gota del reactivo Nitrato A y 1 gota del Nitrato B, se observó luego de 60 segundos, si se produjo un color rojo indica que el nitrato ha sido reducido a nitrito y si se mantiene amarillo o incoloro se añadió una



pequeña cantidad de polvo de zinc. Esto indicará si el nitrato ha sido completamente reducido a nitrógeno gas.

Ej. Después de la adición del Nitrato A + B:

Rojo = Positivo                                      Incoloro / amarillo = Negativo

Después de la adición de polvo de zinc:

Incoloro / amarillo = Positivo                      Rojo = Negativo

Se anotó estos resultados adicionales en la hoja de resultados proporcionada. (MICROGENTM GN-ID IDENTIFICACIÓN. 2004)

#### Tira GN B

- Se retiró la laminilla adherente y se apuntó todas las reacciones positivas con la ayuda de la carta de color, se registraron los resultados en la hoja de resultados proporcionada.

- Se observó los pocillos específicos según se indica:

- ✓ El pocillo de gelatina (13) se leyó posterior a 18-24 horas para Enterobacteriaceae y luego de 48 horas para los oxidasa positivos. El resultado es positivo si se observan partículas negras a través del pocillo, esto es resultado de la licuefacción de la gelatina.

- ✓ El pocillo de la arginina se interpretó de otra manera, luego 24 y 48 horas de incubación: (MICROGENTM GN-ID IDENTIFICACIÓN. 2004)

24 horas (Enterobacteriaceae)

Amarillo = Negativo

Verde/Azul = Positivo

48 horas (Organismos Oxidasa positivos)

Amarillo / verde = Negativo

Azul = Positivo

#### **3.11.2. Identificación**

En la hoja de resultados de Microgen GN-ID A+B, los substratos se organizaron en tripletes (sets de 3 reacciones) y se estableció un valor numérico a cada substrato (1, 2 o 4). La suma de las reacciones positivas para cada triplete dió un dígito, el Perfil numérico, que se manejó para estipular la identidad del organismo aislado. El Perfil numérico se introdujo en el Software Microgen Identification System (MID-60), que generó un informe de los cinco microorganismos más parecidos en una base de datos selectiva. El software suministró una identificación basada en probabilidad, en % de probabilidad y en el parecido con un análisis de la calidad de la diferenciación. (MICROGENTM GN-ID IDENTIFICACIÓN. 2004)

### CAPITULO III

#### 4. MARCO DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

##### 4.1 Parámetros fisicoquímicos

**Tabla 4-3.** Resultados de los parámetros fisicoquímicos “in situ” del Agua termal de Guayllabamba en los dos puntos de muestreo

Muestra	T° (°C)	Ph	STD (ppm)	Conductividad (CE)( $\mu\text{S/cm}$ )
# 1	40,2	6,82	683	1356
# 2	39,8	6,96	694	1351
<b>Promedio</b>	40	6,89	689	1354

Realizado por: Vanesa Veintimilla

En la tabla 4-3 podemos visualizar que la temperatura promedio del agua termal de Guayllabamba fue de 40°C sabiendo que la temperatura promedio del ambiente es de 12 °C siendo la temperatura promedio del afluente de 28°C superior a la temperatura del ambiente, motivo por el cual estas aguas son consideradas termales y tomando como referencia la clasificación según la temperatura estas aguas son mesotermales cuyas temperaturas están entre 30-40 °C. (GÓMEZ, D., et al. 2005. p 205).

Esta clasificación de termalidad también ha sido utilizada por autores como Moreno y col. Para clasificar a las aguas de la fuente termal de Tirandá en el estado Trujillo Venezuela como mesotermales pues la temperatura de sus aguas fue de 39°C, de igual manera autores como De la Rosa y col., en sus estudios realizados en el manantial mesotermal Puente Viesgo, donde sus aguas tuvieron una temperatura de 35°C. (FLORES. 2013).

Un factor muy importante que controla el crecimiento microbiano es la temperatura pues cada microorganismo requiere de un intervalo específico de temperatura para desarrollarse, además el pH también afecta el crecimiento microbiano, ya que cada especie conserva un intervalo de pH definido para crecer. La mayoría de las bacterias crecen entre pH 5,5 y 8. (FLORES. 2013).

El pH promedio de estas aguas termales de Guayllabamba es 6,89 lo que indica que es ligeramente ácido, muy cercano a los valores registrados por el INAMHI en el Atlas de las Aguas Termominerales en el Ecuador realizados en el año 2013, donde el pH del agua inscrito fue de 6.5. Otros de los manantiales termales registrados con un pH similar son Puente Viesgo, Alicún de la

Torre y Santa Apolonia ubicados en España, donde su pH promedio es de 7, el origen de estos pH ácidos o ligeramente básicos se debe a que las aguas de estos manantiales están compuestas principalmente por iones sulfatos y sulfitos que forman ácido sulfhídrico en aguas subterráneas. Cabe mencionar que el pH de cada manantial dependerá de su composición química (FLORES. 2013).

Los Sólidos Totales Disueltos promedio de este manantial termal fue de 689 ppm, valor inferior al obtenido por la INAMHI en el 2013 que fue de 870 ppm, lo cual es indicativo que existe una disminución de sales minerales, las mismas que pueden ser consecuencia de la explotación de las capas del suelo al cabo de algunos años.

Finalmente la conductividad promedio obtenida en las aguas termales de Guayllabamba fue de 1354  $\mu\text{S}/\text{cm}$  mientras que el valor registrado por el INAMHI fue de 1359  $\mu\text{S}/\text{cm}$  esto indica que hay una ligera disminución en la concentración de iones ya que la conductividad está directamente vinculada con la cantidad de sólidos totales disueltos, por lo tanto demuestra que los valores obtenidos en este estudio tanto de STD como de CE concuerdan con los registrados por Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología del Ecuador, instituto que a su vez es miembro de la Organización Meteorológica Mundial, OMM, organización intergubernamental especializada de las Naciones Unidas para la Meteorología (el tiempo y el clima), la Hidrología Operativa y las ciencias conexas. (INAMHI. 2013).

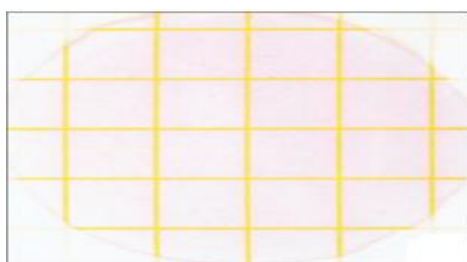
#### 4.2. Bacterias aerobias mesófilas

**Tabla 5-3.** Resultado de las Bacterias Aerobias mesófilas en Placas procedentes del agua termal de Guayllabamba

Muestra	Valores promedios de Bacterias Aerobias mesófilas (UFC/mL)
1	$10^5$
2	$10^5$

Realizado por: Vanesa Veintimilla

**Figura 6-3.** Resultado de las Bacterias Aerobias mesófilas en Placas Petrifilm



Fuente: (3M, 2003)

Cuando existen conteos muy altos de Bacterias Aerobias mesófilas, el área total de crecimiento puede virar o colorearse rosa, en ciertos casos se puede visualizar colonias individuales únicamente en el borde del área de crecimiento de la Placa Petrifilm. Por lo que se registra este conteo como muy numeroso para contar (MNPC) lo cual según 3M, 2003 es un conteo estimado de  $10^5$  UFC/mL.

Este resultado de las Bacterias Aerobias mesófilas registrado según 3M está respaldado por la AOAC INTERNATIONAL, (Association of Official Agricultural Chemists) que tiene por objetivo ser un proveedor activo en el ámbito mundial, responsable de la organización, desarrollo, empleo y armonización de métodos analíticos validados y programas de aseguramiento de la calidad de los servicios de laboratorio.

De las placas Petrifilm de Bacterias Aerobias mesófilas se aislaron 8 bacterias de la muestra uno y 2 de la muestra dos, lo cual al cabo de incubarlas en condiciones óptimas mostraron crecimiento microbiano, comprobando la presencia de estas bacterias y a la vez evidenciando que existe un problema de higiene en estas aguas termales, la mayoría de bacterias mesófilas crecen a temperaturas entre 37 °C que se adaptan a condiciones elevadas de temperatura como pudo haber sucedido en este caso.

Otro criterio según ANDUEZA, (2014) menciona que la presencia de bacterias Aerobias mesófilas en numerosas cantidades demuestra problemas de higiene y contaminación del agua, lo cual asevera lo antes mencionado.

Según la NORMA DE CALIDAD AMBIENTAL Y DE DESCARGA DE EFLUENTES: RECURSO AGUA, estas bacterias son Indicadoras de Contaminación ya que desde el punto de vista sanitario las condiciones bacteriológicas del agua son fundamentales y de acuerdo con la Norma Bacteriológica de Calidad establece que el agua debe estar exenta de patógenos de origen entérico y parasitario intestinal que son los responsables de transmitir enfermedades como salmonelosis, shigelosis, amebiasis, etc.

Este resultado obtenido puede ser consecuencia de un inadecuado tratamiento del agua, ya que un recuento alto de UFC/mL de bacterias Aerobias evidencia probablemente que el agua ha estado conservada en condiciones no adecuadas de tiempo y temperatura lo que ha permitido el desarrollo de microorganismos y no necesariamente que dicha contaminación sea de origen fecal.

### 4.3. Coliformes totales y fecales

**Tabla 6-3.** Resultado de Coliformes totales y fecales procedentes del agua termal de Guayllabamba

Muestra	Coliformes totales	Coliformes fecales	Media	Desviación estándar	Varianza
1	Ausencia	Ausencia	-	-	-
2	Ausencia	Ausencia			

Realizado por: Vanesa Veintimilla

El resultado de Coliformes totales y fecales no mostró crecimiento de colonias, lo cual indica que el agua es bacteriológicamente segura ya que no existe contaminación fecal, este criterio ha sido consolidado con lo expuesto por ALZAMORA, S., et al. 2004., donde menciona que las bacterias Coliformes totales y fecales son indicadores de contaminación fecal en el control de calidad del agua destinada al consumo humano debido a que los coliformes son más resistentes que las bacterias patógenas intestinales.

De igual manera otro criterio según ANDUEZA, Félix. 2014, aduce que la ausencia de este grupo de microorganismos Coliformes totales y fecales es indicativo que el agua presenta adecuadas condiciones de higiene y que se descarta la posibilidad de que el agua esté contaminada con patógenos, como *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus*.

Este resultado es relativo a lo especificado en La Legislación española (BOE número 226 del 20 de Septiembre de 1990, relativa a la reglamentación técnico sanitaria para el abastecimiento y control de calidad de las aguas potables de consumo público), donde menciona: “La fuente de agua termal es de utilidad pública y como tal debe cumplir las condiciones de portabilidad de agua”.

El resultado de ausencia de Coliformes totales y fecales en las aguas termales de Guayllabamba no coincide con el estudio realizado en la fuente termal de O Tinteiro en Ourense, España que muestra la presencia significativa microorganismos en casi todos los seis puntos muestreados, cuyo origen de dicha contaminación se debe a la afluencia de microorganismos provenientes de las inmediaciones, donde existe un colector residual y cuyos desechos son transmitidos hasta la fuente termal a través del río que existe en el lugar. La fuente termal de Guayllabamba también se encuentra junto a un río, pero no existe este tipo de contaminación, lo que significa que a pesar de la afluencia de personas en este balneario, existe un adecuado manejo de los desechos por parte de los bañistas y del personal que labora en el lugar. (VENDRELL, M., et al. 1998).

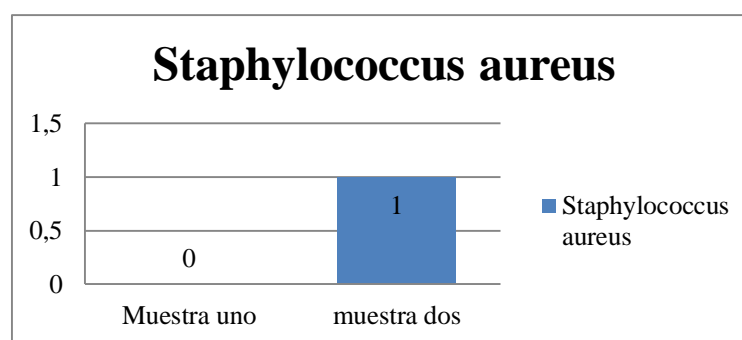
#### 4.4. *Staphylococcus*

**Tabla 7-3.** Resultado de *Staphylococcus aureus* procedentes del agua termal de Guayllabamba

Muestra	<i>Staphylococcus aureus</i>	Media	Desviación estándar	Varianza
1	0	0,5	0,707106781	0,5
2	1			

Realizado por: Vanesa Veintimilla

**Gráfico 1-3.** Resultado de las Bacterias *Staphylococcus aureus* procedentes del agua termal de Guayllabamba



Realizado por: Vanesa Veintimilla

Se evidenció el crecimiento de un único *Staphylococcus aureus* en las placas Petrifilm selectivas. Esta bacteria está relacionada con enfermedades no asociadas a diarrea, principalmente afecciones de mucosas muy relacionadas con el baño: conjuntivitis, otitis y problemas cutáneos. (ALZAMORA, S., et al. 2004).

El *Staphylococcus aureus* es ampliamente distribuido en el ambiente y forma parte de la gran diversidad de los microorganismos autóctonos de las aguas minerales de balnearios termales. (MOSSO, et al. 1994). Por lo tanto este resultado no indica mayor grado de peligro para la salud de los bañistas debido a su escasa presencia en estas Aguas termales.

Otros estudios realizados en los manantiales termales de Santa Apolonia y La Mitisús del estado de Mérida en Venezuela también revelaron la presencia de los géneros *Staphylococcus*, lo cual confirma que en otros manantiales termales, con características similares a las de Guayllabamba también existen reportes de este tipo de bacterias. (FLORES. 2013).

En las aguas mineromedicinales del balneario de Fuente Amarga, España, igualmente se aislaron un bajo número de bacterias del género *Staphylococcus*, género frecuentemente aislado en manantiales termales. La fuente termal del Tinteiro, España determinó la presencia de diversos patógenos para humanos, entre estos *Staphylococcus*. Este también es el caso del balneario de Alhama en España donde se encontró el género *Staphylococcus* en cantidades muy bajas, este género se halla abundantemente esparcido en diferentes ambientes, por lo que su contaminación en manantiales termales puede deberse al suelo, la lluvia, o el aire.

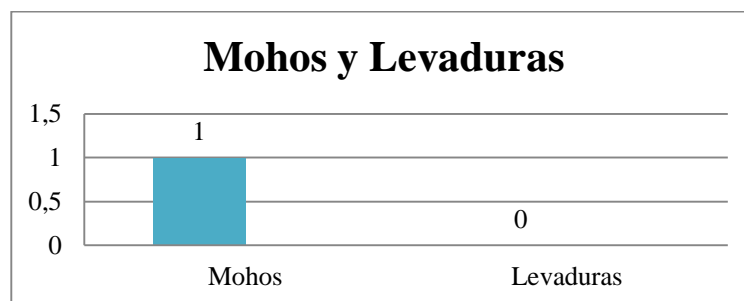
#### 4.5. Mohos y levaduras

**Tabla 8-3.** Resultado de Mohos y Levaduras procedentes del agua termal de Guayllabamba

Muestra	Mohos	Levaduras	Media	Desviación estándar	Varianza
1	1	Ausencia	0,25	0,5	0,25
2	Ausencia	Ausencia			

Realizado por: Vanesa Veintimilla

**Gráfico 2-3.** Resultado de Mohos y Levaduras procedentes del agua termal de Guayllabamba



Realizado por: Vanesa Veintimilla

Se registró la presencia de un Moho y ninguna levadura en la Placa Petrifilm selectiva, la presencia de altos valores de este grupo de microorganismos eucariotas aerobios demuestran problemas de higiene, limpieza y contaminación ambiental. (ANDUEZA, Félix. 2014).

Pero debido al resultado mínimo obtenido se puede deducir que este microorganismo puede provenir de otros hábitats (suelo, vegetales) cercano a las aguas termales y que se adaptó a estas condiciones adversas (DE LA ROSA, J., & MOSSO, M. 2000), o incluso pudo ser contaminación de alguna otra muestra de agua en el laboratorio ya que mostró crecimiento en una sola placa a los 15 días de incubación.

Estudios realizados para investigar la actividad antimicrobiana del fango termal en el Complejo Termal Copahue en Argentina, sobre microorganismos de la microbiota autóctona del hombre, agentes infecciosos de la comunidad, hospitalarios y cepas AT CC se encontraron cepas correspondieron a cocos Gram positivos, bacilos Gram negativos y levaduras, pero ningún hongo como sucedió en el manantial termal de Guayllabamba.

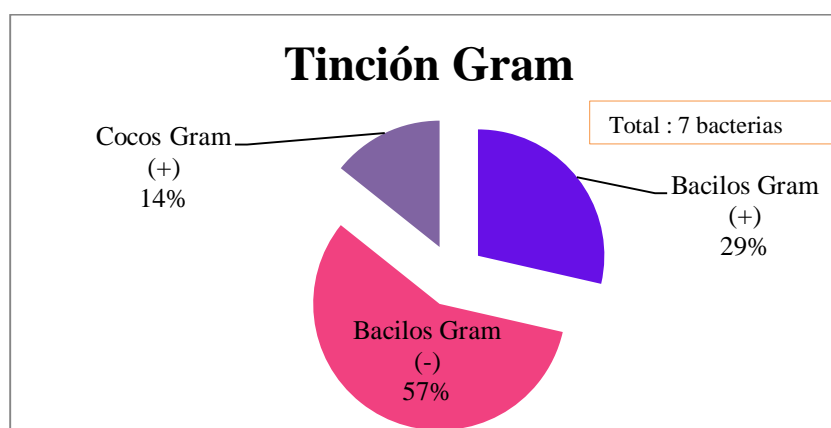
#### 4.6. Pruebas para selección e identificación de bacterias

**Tabla 9-3.** Número y porcentaje de bacterias Gram positivas y Gram negativas aisladas, procedentes del agua termal de Guayllabamba

Codificación de la Bacteria	Origen	Petrifilm	Tinción Gram	Porcentaje (%)
# 5	Ojo de agua M1	AC	Bacilos Gram (-)	57%
# 6	Ojo de agua M1	AC	Bacilos Gram (-)	
# 11	Ojo de agua M1	AC	Bacilos Gram (-)	
# 13	Ojo de agua M2	AC	Bacilos Gram (-)	
# 12	Ojo de agua M1	AC	Bacilos Gram (+)	29%
# 7	Ojo de agua M1	AC	Bacilos Gram (+)	
# 27	Ojo de agua M2	STX	Cocos Gram (+)	14%

Realizado por: Vanesa Veintimilla

**Gráfico 3-3.** Número y porcentaje de bacterias Gram positivas y Gram negativas aisladas, procedentes del agua termal de Guayllabamba



Realizado por: Vanesa Veintimilla

De acuerdo a los resultados conseguidos, revelan que en esta agua termal existe la presencia en mayor número de bacterias Bacilos Gram (-), lo cual concuerda con lo expuesto en MOSSO, et al. 1994., "En las mesotermas predominan los bacilos Gram negativos y los cocos Gram positivos. Mientras que en las aguas termominerales las Gram (+) son mayormente registradas, los principales



géneros identificados han sido: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Enterobacter*, *Acinetobacter* y *Arthrobacter*. Los bacilos Gram positivos irregulares como *Arthrobacter*, *Kurthia*, *Corynebacterium*, *Cellulomonas*, *Exiguobacterium*, *Rubrobacter* se localizan generalmente en aguas hipertermales o carbónicas”

En estudios realizados en manantiales mineromedicinales del Balneario de Alicún de las Torres (Granada) también se encontraron en mayor cantidad Bacilos Gram negativos en un porcentaje de 54,5% y en menor cantidad bacilos con 29,10% y cocos Gram negativos 16,4%, lo que manifiesta que la microbiota autóctona en este manantial al igual que de las aguas termales de Guayllabamba están constituidos principalmente por bacilos Gram negativos. (FLORES. 2013).

En otros análisis realizados en diferentes aguas de los manantiales mineromedicinales de la región de Jaraba, España, igualmente el 65% resultaron bacterias Gram negativas y solo un 35% estuvo constituido por bacterias Gram positivas.

En manantiales mesotermiales de Puente Viesgo, España, se registraron cepas de bacterias correspondientes en su mayoría a los tipos morfológicos de bacilos Gram negativos (62,5%) y en una menor proporción bacilos y cocos Gram positivos (37,5%). Lo mismo sucedió en el manantial Alicún de las Torres donde el 54,5% de los microorganismos aislados fueron bacterias Gram negativas y 45,5% lo representan las bacterias Gram positivas. (FLORES. 2013).

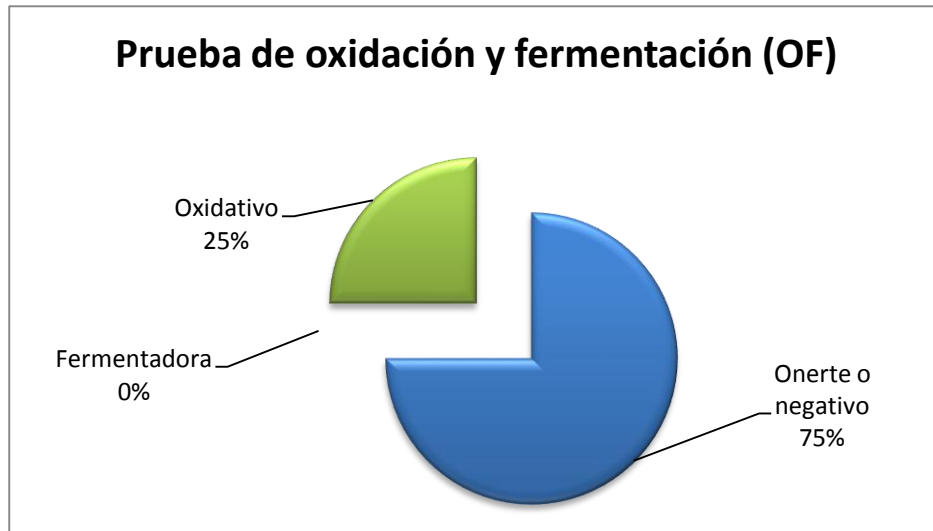
Por lo tanto esta agua termal de Guayllabamba de origen volcánico rica en sulfuro como en estudios similares realizados en diferentes balnearios presenta una microbiota autóctona en la que predominan las bacterias Bacilos Gram negativos. (BORJA, Jackelyn., et al. 2012).

**Tabla 10-3.** Resultado de las pruebas bioquímicas realizadas a las bacterias Bacilos Gram (-) procedentes del agua termal de Guayllabamba

Bacteria	Origen	Petrifilm	Prueba de oxidación y fermentación (OF)		Porcentaje (%)
			Con aceite mineral	Sin Aceite mineral	
# 5	Ojo de agua M1	AC	Sin cambio	Reporta cambio de color	25%
# 6	Ojo de agua M1	AC	Sin cambio	Sin cambio	75%
# 11	Ojo de agua M1	AC	Sin cambio	Sin cambio	
# 13	Ojo de agua M2	AC	Sin cambio	Sin cambio	

Realizado por: Vanesa Veintimilla

**Gráfico 4-3.** Resultado de las pruebas bioquímicas realizadas a las bacterias Bacilos Gram (-) procedentes del agua termal de Guayllabamba



Realizado por: Vanesa Veintimilla

El Agar OF es utilizado particularmente para establecer si los bacilos Gram negativos utilizan carbohidratos fermentativa u oxidativamente, o si no los utilizan del todo. La utilización de carbohidratos proveniente de las bacterias puede ser fermentativa como en el caso de bacterias anaerobias, las bacterias facultativas pueden fermentar en ausencia de oxígeno u otro aceptor de electrones, o degradar carbohidratos oxidativamente, mientras que las aerobias estrictas pueden degradar carbohidratos únicamente mediante metabolismo oxidativo en presencia de aceptores inorgánicos de electrones. (RODRÍGUEZ, Evelyn., et al. 2005).

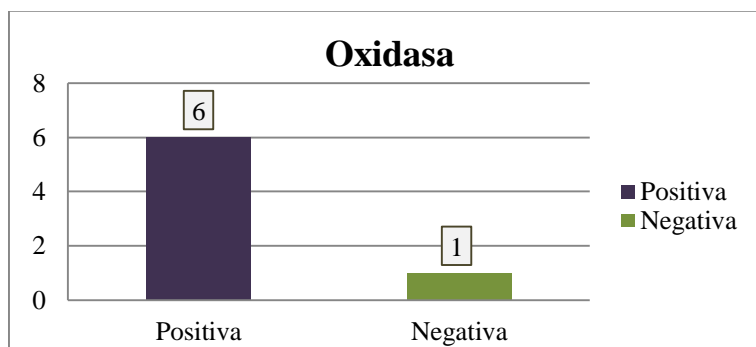
De acuerdo a los resultados obtenidos tres bacterias Gram negativas son inertes ya que ninguno de los tubos han sufrido cambio alguno por lo revelan un resultado negativo o no sacarolítico debido a que no consume glucosa. No existen bacterias fermentadoras facultativas ya que en ningún caso ambos tubos han cambiado de color a amarillo, es decir que la fermentación de carbohidratos no ha producido suficiente ácido como para virar los indicadores de pH del medio. Finalmente se tiene una bacteria que es Oxidativa debido a que se reportó un cambio de color a amarillo en el tubo sin aceite y el otro tubo con aceite mantuvo su color inicial, lo cual significa que la cantidad de ácidos formada durante la reacción es mucho menor. (BEJAR, V., et al. 2015)

**Tabla 11-3.** Resultado de las pruebas de oxidasa positiva y negativa de las bacterias aisladas procedentes del agua termal de Guayllabamba

Codificación de la Bacteria	Origen	Petrifilm	Oxidasa
# 5	Ojo de agua M1	AC	+
# 6	Ojo de agua M1	AC	+
# 11	Ojo de agua M1	AC	+
# 13	Ojo de agua M2	AC	+
# 12	Ojo de agua M1	AC	+
# 7	Ojo de agua M1	AC	+
# 27	Ojo de agua M2	STX	-

Realizado por: Vanesa Veintimilla

**Gráfico 5-3.** Resultado de las pruebas de oxidasa positiva y negativa de las bacterias aisladas procedentes del agua termal de Guayllabamba



Realizado por: Vanesa Veintimilla

La prueba de oxidasa es muy utilizada para determinar si una bacteria produce alguna de las citocromo c oxidasas, como resultado se obtuvo que seis bacterias son oxidasa positiva, es decir que la bacteria utiliza el oxígeno para la producción de energía con una cadena de transferencia de electrones y una única bacteria es oxidasa negativa, esto indica que no contiene citocromo c oxidasa y no se puede utilizar el oxígeno para la producción de energía con una cadena de transferencia de electrones o utiliza un citocromo diferente para la transferencia de electrones al oxígeno. (MACFADDIN. 2003)

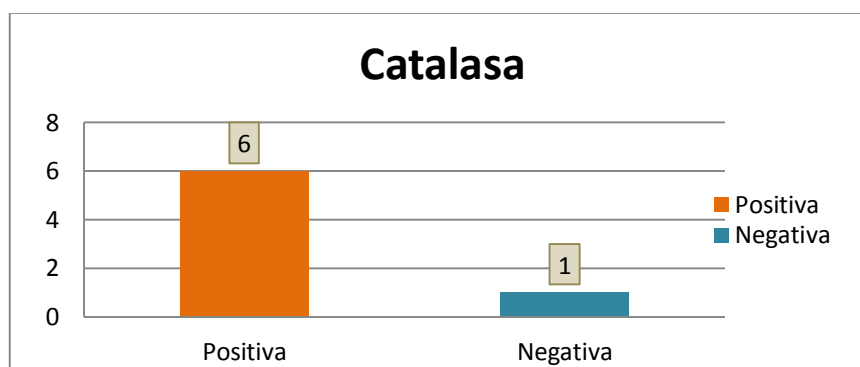
Los géneros ordinariamente que presentan oxidasa positiva son pseudomonadaceae, para una identificación preliminar de *Neisseria* frente a *Moraxella* las cuales además son diplococos Gram negativas; entre otros están *Helicobacter pylori*, *Vibrio cholerae* y *Campylobacter jejuni*, *Legionella pneumophila*; y entre los que presentan oxidasa negativa tenemos a los Enterobacteriaceae. (MACFADDIN. 2003)

**Tabla 12-3.** Resultado de las pruebas de catalasa positiva y negativa de las bacterias aisladas procedentes del agua termal de Guayllabamba

Codificación de la Bacteria	Origen	Petrifilm	Catalasa
# 5	Ojo de agua M1	AC	-
# 6	Ojo de agua M1	AC	-
# 11	Ojo de agua M1	AC	-
# 13	Ojo de agua M2	AC	-
# 12	Ojo de agua M1	AC	-
# 7	Ojo de agua M1	AC	-
# 27	Ojo de agua M2	STX	+

Realizado por: Vanesa Veintimilla

**Gráfico 6-3.** Resultado de las pruebas de catalasa positiva y negativa de las bacterias aisladas procedentes del agua termal de Guayllabamba



Realizado por: Vanesa Veintimilla

Esta prueba es útil ya que cataliza la formación de agua y oxígeno a partir del peróxido de hidrógeno. Según los resultados revelan claramente que 6 de las bacterias a identificar presentan catalasa positiva, este aporte nos permite distinguir entre *Streptococcus* (catalasa negativa) de *Staphylococcus* (catalasa positiva) y *Clostridium* (negativa) de *Bacillus* (positiva). (MACFADDIN. 2003)

También se tiene la presencia de un bacterioco Gram positivo que registró catalasa positiva. Dentro del grupo de los cocos catalasa-positivos se encuentran los géneros *Staphylococcus* y *Micrococcus*. Una diferencia entre estos dos géneros es que los estafilococos no crecen a temperaturas inferiores a 7°C y por lo tanto no causarían problemas en alimentos adecuadamente refrigerados. Numerosas cepas de *Staphylococcus aureus* producen una potente enterotoxina. (MACFADDIN. 2003)

**Tabla 13-3.** Resultado de las pruebas realizadas a las bacterias bacilos Gram negativas procedentes del agua termal de Guayllabamba

Bacteria	Tinción Gram	Oxidasa	Catalasa	Movilidad	OF (72horas)		PRUEBAS BIOQUÍMICAS				
					Con vaselina	Sin vaselina	Kligler		Citrato	Urea	SIM
							Cambio a amarillo	Presencia de Gas	Cambio a azul	Cambio a rosado	Indol cambio a rosado
# 5	Bacilos Gram (-)	+	-	+	-	+	alcalino	+	-	alcalina/ácida	-
# 6	Bacilos Gram (-)	+	-	+	-	-	ácido	-	-	ácida/ácida	-
# 11	Bacilos Gram (-)	+	-	-	-	-	alcalino	-	-	ácida/ácida	-
# 13	Bacilos Gram (-)	+	-	+	-	-	alcalino	+	-	ácida/ácida	-

Realizado por: Vanesa Veintimilla

En los balnearios de aguas mesotermales según estudios realizados en múltiples balnearios termales exhiben que la microbiota característica que se encuentra en mayor cantidad corresponde a los bacilos Gram negativos, resultado que concuerda con este análisis realizado en las aguas termales de Guayllabamba donde muestra en mayor cantidad bacilos Gram negativos. (FLORES. 2013).

Todas las bacterias bacilos Gram negativos encontradas dieron como resultado oxidasa positiva lo cual ayuda a diferenciar Enterobacterias (Todas Oxidasa negativas) de otras especies como *Pseudomona* o *Neisserias* oxidasa positiva. También todos los microorganismos presentaron catalasa negativa, permitiéndonos distinguir miembros de la familia *Micrococaceae* (catalasa negativa) de miembros de la familia *Streptococcaceae* (catalasa positiva). (BEJAR, V., et al. 2015)

Se tuvo que tres de los microorganismos aislados son móviles y una es inmóvil, las bacterias tienen movilidad gracias a sus flagelos, que se localizan primordialmente entre los bacilos; sin embargo algunas formas de cocos son inmóviles. Tres bacterias son inertes demostrando que las bacterias no consumen glucosa, ninguna bacteria es fermentadora facultativa y una bacteria es Oxidativa es decir que la cantidad de ácidos formada es menor.

Las pruebas bioquímicas ayudaron a identificar algunas de las bacterias para las cuales se tomó como referencia las tablas de identificación según MACFADDIN. 2003., entre las cuales tenemos que las bacterias #5 y #13 corresponden a *Ralstonia picketti* con un porcentaje de identificación del 90%, la bacteria #6 solo se consiguió identificar el género que corresponde a *Methylobacterium*

*spp.*, con un porcentaje de identificación del 86%, mientras que la bacteria #11 no se obtuvo resultados suficientes, por lo que fue necesario realizar una prueba mediante el sistema de Microgen, mediante el cual reveló que esta última bacteria pertenece al género *Moraxella spp*, con un porcentaje de probabilidad del 81,29%.

En estudios realizados en los manantiales termales de Santa Apolonia y de La Mitisús también se reportaron la presencia en mayor cantidad de bacterias Gram negativas entre las cuales se logró identificar la presencia del género *Ralstonia*. (FLORES. 2013).

Estudios realizados de aislados de fuentes clínicas y ambientales incluidos el agua de alta pureza, identificaron quince de cincuenta y nueve *R. pickettii* de orígenes clínicos, industriales y ambientales que se compararon basándose en características genotípicamente y fenotípicamente mediante pruebas bioquímicas. (RYAN, M., et al. 2011).

**Tabla 14-3.** Resultado de las pruebas realizadas a las bacterias Gram positivas procedentes del agua termal de Guayllabamba

Código Bacteria	Tinción Gram	Oxidasa	Catalasa	Almidón	Gelatina	Eosina	Manitol
# 12	Bacilos Gram (+)	+	-	-	+		
# 7	Bacilos Gram (+)	+	-	-	+		
# 27	Cocos Gram (+)	-	+			+	+

Realizado por: Vanesa Veintimilla

Del número total de bacterias aisladas de este análisis se encontraron 2 bacterias bacilos Gram positivas y una sola bacteria Coco Gram positivo. “Los cocos Gram positivos, *Staphylococcus* y *Micrococcus* debido a su gran resistencia a elevadas concentraciones de sal, se hallan a menudo en aguas minerales.”. (DE LA ROSA, J., & MOSSO, M. 2000).

Dos de estas bacterias son oxidasa positiva, algunas de las familias con esta característica son *Pseudomona* o *Neisserias* y catalasa negativa que generalmente corresponden a la familia *Micrococaceae*. Solo una bacteria es oxidasa negativa pudiendo pertenecer a las Enterobacterias y catalasa positiva cuya familia generalmente corresponde a *Streptococcaceae*. (BEJAR, V., et al. 2015)

Las pruebas de almidón y gelatina sirvieron para confirmar que las bacterias #12 y #7 pertenecen al género *Bacillus spp.*, ya que basta que una de ella sea positiva y sumando los resultados de oxidasa positiva y catalasa negativa permitieron obtener un porcentaje de identificación del 70% respecto a sus pruebas confirmatorias para este tipo de microorganismos. (MACFADDIN. 2003)

Mientras que para la bacteria #27 que proviene del Petrifilm selectivo para *Staphylococcus* a más de ello es oxidasa negativa y catalasa positiva, en las pruebas de eosina mostró resultado positivo y en la prueba confirmatoria de manitol presentó fermentación amarillenta, arrojó un resultado positivo con un 100% en las pruebas de identificación para *Staphylococcus aureus*.(MACFADDIN. 2003)

En estudios realizados en el manantial de Santa Apolonia y en el manantial de La Mitisús. Se encontraron en menor proporción bacterias Gram positivas, específicamente cocos Gram positivos los cuales corresponden al género *Staphylococcus* debido a pruebas bioquímicas concernientes, donde se observó que son catalasa positiva y presentan crecimiento en manitol salado pero sin fermentación, por lo que se descartó que las especies encontradas pertenecieran a la especie *Staphylococcus aureus*.

**Tabla 15-3.** Bacterias identificadas procedentes del agua termal de Guayllabamba

<b>Codificación de la Bacteria</b>	<b>Origen</b>	<b>Petrifilm</b>	<b>Tinción Gram</b>	<b>Bacteria Identificada</b>
# 5	Ojo de agua M1	AC	Bacilos Gram (-)	<i>Ralstonia pickettii</i>
# 6	Ojo de agua M1	AC	Bacilos Gram (-)	<i>Methylobacterium spp</i>
# 11	Ojo de agua M1	AC	Bacilos Gram (-)	<i>Moraxella spp</i>
# 13	Ojo de agua M2	AC	Bacilos Gram (-)	<i>Ralstonia pickettii</i>
# 12	Ojo de agua M1	AC	Bacilos Gram (+)	<i>Bacillus spp</i>
# 7	Ojo de agua M1	AC	Bacilos Gram (+)	<i>Bacillus spp</i>
# 27	Ojo de agua M2	STX	Cocos Gram (+)	<i>Staphylococcus aureus</i>

**Realizado por:** Vanesa Veintimilla

En este estudio microbiológico de las muestras de la fuente termal de Guayllabamba según la **Tabla 15-3.**, se logró aislar 7 cepas bacterianas. Al analizar la tabla 15 se observa que la mayor parte de las bacterias analizadas e identificadas corresponden a bacterias Gram negativas y pocas bacterias Gram positivas.

Se aislaron 6 de las 7 cepas mediante pruebas bioquímicas, una se identificó mediante el sistema de Microgen y de todas las cepas analizadas, se logró identificar únicamente a nivel de género 4 cepas, de las otras tres se obtuvieron también la especie.

Se encontró que en el manantial de agua termal de Guayllabamba existe la presencia de géneros *Ralstonia*, *Methylobacterium*, *Moraxella*, *Bacillus* y *Staphylococcus*.

Según estudios en el manantial termal de La Mitisús en el estado de Mérida se encontró la presencia del género *Ralstonia*. También Lee y col. en el 2001, aislaron una bacteria termotolerante, del manantial termal de la ciudad de Pohang, en Corea, esta cepa fue bacilo Gram negativo, aeróbica, que crece a una temperatura óptima de 42°C y según los estudios realizados pertenecía al género *Ralstonia*. Este género ocupan varios nichos, pocas veces se asocian con infecciones humanas, pero pueden originar problemas a plantas y vegetales como la papa, tomate y plátano, también son considerados como organismos de gran importancia, por su posible uso como agentes para la bioremediación de suelos y aguas contaminadas con metales pesados y compuestos organoclorados

Entre los pocos estudios documentados hasta la fecha del desarrollo del biofilm en tuberías de acero inoxidable en la red de agua, resultados evidenciaron el desarrollo de biopelículas en un tiempo mayor a 12 meses, se evidenció una mezcla de bacterias de biopelícula unidos al acero inoxidable, la formación de micro colonias de bacterias y diatomeas en forma de varilla y en forma de cocoides, incluyendo *Pseudomonas spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Corynebacterium / Arthrobacter spp.*, *Micrococcus spp.* y *Methylobacterium spp.* Este último grupo de bacterias son comúnmente aislados de diversos ambientes naturales como superficie tierra, hojas, polvo y agua dulce. (PERCIVAL, et al. 1998).

También se han reportado contaminación del agua del grifo por especie *Methylobacterium* lo cual ha provocado preocupación en hospitales Japoneses y sensibilidad a los antibióticos de los aislamientos en 2004, entre las cuales las especies dominantes de *Methylobacterium* en agua hospitalaria fueron *M. aquaticum* y *M. fujisawaense*. (FURUHATA, et al. 2006).

Según estudios en el Balneario de Arbieta (Vizcaya) en 1897, realizados por el Dr. Santiago García Fernández, en el que mediante observaciones microscópicas incluyó recuentos y cultivos de los microorganismos, identificando entre ellos a *Leptothrix*, *Beggiatoa*, *Micrococcus* y *Bacillus*.

En los manantiales termales de Santa Apolonia y La Mitisús que presentan características similares a las del agua termal de Guayllabamba se determinó la presencia de los géneros *Burkholderia*, *Pseudomonas* y *Staphylococcus*, de igual manera este género fue encontrado en análisis realizados en el balneario de Alicún de las Torres, en Granada, España. Este tipo de microorganismo es el que con más frecuencia se aísla en muestras clínicas, y pueden causar infecciones por multiplicación tanto local como sistémica. (FLORES. 2013).

En estudios realizados en los manantiales del municipio de Banderilla, Veracruz se han reportado especies de *Moraxella*, de manera similar sucede en lo reportado por Lamba *et al.* (1980) en su



estudio realizado en agua de consumo humano cercano a Oregón donde determinó la existencia de especies como *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Moraxella*, situación parecida ocurrió en análisis de aguas subterráneas de Yucatán realizadas por PACHECO, *et al.* 1999.

Estos aportes de estudios realizados alrededor del mundo, nos indican que este tipo de los microorganismos *Ralstonia*, *Methylobacterium*, *Moraxella*, *Bacillus* y *Staphylococcus*, son encontrados en aguas termales de varias regiones en el mundo, pues su hábitat es muy variado, y está comprobado que el agua termal de Guayllabamba no es la excepción, quizá en una mínima cantidad pero existen.

## CONCLUSIONES

Del estudio realizado en agua termal de Guayllabamba ubicado en la Provincia de Chimborazo, no reportó crecimiento de bacterias coliformes totales y fecales en el Petrifilm para *E. coli*/ coliformes, se extrajeron seis bacterias de la placa para Recuento de Aerobios, existió el desarrollo de un *Staphylococcus* en la placa Staph Express y un moho en la placa para Mohos y Levaduras.

Se aislaron un total de 7 colonias bacterianas, de las cuales solo 3 bacterias se identificaron a nivel de género y especie, mientras de que las otras 4 solo se obtuvieron el género.

La mayor proporción de Bacterias aisladas fueron bacilos Gram negativas y en menor cantidad bacilos Gram positivas y cocos Gram positivos.

De las bacterias bacilos Gram negativas aisladas tres de ellas son inertes debido a que no han consumido glucosa, una es Oxidativa y ninguna de ellas tiene un metabolismo Fermentativo.

Utilizando las pruebas bioquímicas se lograron identificar 6 bacterias, tres a nivel de género únicamente y tres incluida su especie.

Utilizando el sistema de Microgen™ GN-ID se logró identificar a la última bacteria solo a nivel de género.

Los géneros encontrados en el agua termal de Guayllabamba fueron *Ralstonia*, *Methylobacterium*, *Moraxella*, *Bacillus* y *Staphylococcus*, los géneros encontrados con mayor frecuencia fueron *Ralstonia* y *Bacillus*

Las especies bacterianas identificadas en el agua termal de Guayllabamba fueron *Ralstonia pickettii* y *Staphylococcus aureus* y la especie encontrada con mayor frecuencia fue *Ralstonia pickettii*

Este estudio constituye el primer reporte de aislamiento de *Ralstonia pickettii*, *Methylobacterium spp*, y *Moraxella spp* en aguas termales del Ecuador

## **RECOMENDACIONES**

Realizar estudios microbiológicos con el objetivo de conocer la microbiota autóctona que conforma cada uno de los manantiales en el Ecuador.

Efectuar análisis microbiológicos periódicos en el Agua termal de Guayllabamba a fin de realizar una curva estadística de la calidad sanitaria, debido a que estas aguas son usadas para fines curativos y recreativos, mediante la toma de muestras por duplicado, para asegurar la exactitud de los resultados.

Realizar un análisis minucioso de los implementos utilizados para el aseo de estas piscinas a fin de llegar al origen de la pequeña contaminación de estas aguas.

Capacitar al personal que labora en este lugar a cerca de las normas de asepsia para que utilice una vestimenta apropiada y materiales limpios al momento de manipular el agua termal, y así evitar futuras contaminaciones.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

**3M.** Petrifilm™. Guía de interpretación. Durán-Ecuador. 2003. p 80.

**ALZAMORA, S. M., et al.** *Conservación de frutas y hortalizas mediante Tecnologías Combinadas*. Depósitos de Documentos de la FAO en Ecuador. Quito-Ecuador. 2004. p. 28.

**ANDUEZA, Félix.** Microbiología del agua. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Mérida-Venezuela. Universidad de los Andes Mérida. 2014. p. 9.

**ARANGO JARAMILLO, Ma. Cecilia.** Microbiología del Agua. Bogotá-Colombia. Docslide. 2000. p. 71.

**ARMILLO, M., & SAN MARTÍN, J.** *Clasificación de las aguas mineromedicinales*. Curas Balnearias Climáticas. Talasoterapia y Helioterapia. Madrid-España. Complutense. 1994. pp. 219-223.

**BALNEARIOS Y SPAS DE MADRID.** [en línea]. Madrid. 2011. [Consulta: 2014/11/28]

Disponible en: <http://www.balneariosenmadrid.com/aguas.html>

**BEJAR, V. et al.** Pruebas Bioquímicas. Prácticas Online de Microbiología para Farmacéuticos. Granada-España. Universidad de Granada. 2015. p. 5.

**BORJA, Jackelyn., et al.** Bacterias halotolerantes productoras de hidrolasas aisladas de aguas termales de Tarapotó-Perú. Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioquímica. Vol. 15(2). Lima-Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2012. pp. 1-7.

**BRAZ, J.** La formación de biopelículas inducida planta específica de especies *Methylobacterium*. *Revista Brasileña de Microbiología*. Vol.42 (3). São Paulo-Brasil. SciELO. 2011. p. 15.

**CANTÓN CHAMBO.** Asociación de Municipalidades Ecuatorianas. [en línea]. Chimborazo-Ecuador. 2012. [Consulta: 2014/10/25]

Disponible en: <http://www.ame.gob.ec/ame/index.php/institucion/objetivos-estrategicos/65-mapa-cantones-del-ecuador/mapa-chimborazo/265-canton-chambo>

**CARRERA, V., & LAINEZ, A.** Análisis y plan de marketing para redefinir el manejo del complejo termal turístico Telesforo Nillacrés I. – Baños termales San Vicente. Guayaquil. (Tesis

pregrado)( Ec. con mención en Gestión Empresarial). Escuela Superior Politécnica del Litoral, Facultad de Administración de empresas, Escuela de Marketing. Guayaquil-Ecuador. 2002, pp. 89-120.

**CHILUIZA, E.** Plan de Marketing para la comercialización en el Distrito Metropolitano de Quito, de los servicios del balneario de aguas termales medicinales Arco Iris de Chachimbiro, ubicado en la provincia de Imbabura. (Tesis). (Ing. Administración Turística y Hotelera). Universidad Tecnológica Equinoccial. Facultad de ciencias económicas. Escuela de Marketing. Quito-Ecuador. 2009. pp. 43-79.

**DE LA ROSA, J., & MOSSO, M.** *Diversidad microbiana de las aguas minerales Termales.* Panorama actual de las Aguas Minerales y Minero-medicinales en España. Madrid-España. Instituto Tecnológico Geominero de España. 2000. pp. 153-157.

**DE LA ROSA, M., ANDUEZA, F., SÁNCHEZ, M., RODRÍGUEZ, M., & MOSSO, M.** *Microbiología de las aguas mineromedicinales de los Balnearios de Jaraba.* Departamento de Microbiología II. Facultad de Farmacia. Vol. 50. Zaragoza-España. Complutense.. 2004. pp. 521-540.

**DELGADO, M., et al.** Análisis Microbiológico y Físicoquímico del Agua de piscinas de la Isla de Tenerife. *Revista de Sanidad e Higiene Pública* (5), 66. Santa Cruz de Tenerife-España. Universidad de La Laguna. 1992. pp. 281-289.

**DÍAZ, J., OLTREMARI, J., & SAELZER, F.** Bosque. Facultad de Ingeniería Forestal Vol. 1. Santiago de Chile-Chile. Universidad Austral de Chile. 1975. p. 20

**DIEPOLDER, G.** Thermal and Mineral Waters. [en línea]. 2013 [Consulta: 2014/10/21]

Disponible en: <http://geomol.eu/geopotenziale/water?lang=2>

**FAGUNDO, J., et al.** Revisión bibliográfica sobre clasificación de las aguas minerales y mineromedicinales. La Habana-Cuba. Centro Nacional de Termalismo “Víctor Santamarina”. 1996. pp. 1-27.

**FORBES, B.** Técnicas de Tinción para la microscopía óptica. Diagnóstico Microbiológico Buenos Aires-Argentina. Médica Panamericana. 2009. p. 48.

**FURUHATA, Katsunori., et al.** Isolation and Identification of Methylobacterium Species from the Tap Water in Hospitals in Japan and Their Antibiotic Susceptibility. Microbiology and Immunology. Vol. 50(1). Tokio-Japon. Academic Publications Japan. 2006. pp. 11–17.

**GARCÍA, José., & PICAZO, Juan.** Compendio de microbiología médica. Barcelona-España. Harcourt. 1999. pp. 447-500.

**GARCÍA, M., et al.** *Determinaciones microbiológicas de las aguas de consumo público y de recreo.* ATS/DUE. Personal Laboral de la Comunidad Autónoma de Extremadura. Temario Específico. Segunda edición. Vol. II. España. Mad, S. A. 2006. pp. 598-601.

**GÓMEZ, D., et al.** Fisioterapeuta del servicio de salud de la comunidad de Madrid. Madrid-España. Mad. 2005. p. 205.

**INAMHI.** Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología. Aguas Termominerales en el Ecuador. Quito-Ecuador. Inami. 2013. p. 96.

**LAIVA, Manuel.** *Descripción y caracterización de las bacterias coliformes.* Materiales de referencia y comparaciones interlaboratorios. Herramientas para el control de la calidad en laboratorios de ensayo. Santiago de Chile-Chile. Cenma. 2006. pp. 57-60.

**LLOPIS ORREGO, María.** *El agua como fuente de Salud y Placer.* En Bajo la mirada de Heracles: Los usos sociales del agua como fuente de Salud y Placer. Vol. 272. Salamanca-España. Universidad de Salamanca. 2010. p. 347.

**LÓPEZ, J., & RUBIO, J.** Presente y futuro de las aguas subterráneas en la Provincia de Jaé. Madrid-España. Instituto Geológico y Minero de España. 2002. p. 22.

**LÓPEZ, Ma. José., et al.** . Sistemas comerciales multipuebas. Manual de laboratorio de microbiología para el diagnóstico de infecciones respiratorias. Terrassa-Spain. OmniaScience. 2012. pp. 84-92.

**MACFADDIN, Jean.** *Pruebas Bioquímica individuales.* Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3a ed. Buenos Aires-Argentina. Médica Panamericana. 2004. p. 850.

**MANSUR, G., et al.** Bacillus. Chicago, Illinois-Estados Unidos. Enciclopedia Británica. 2014. p. 201.

**MCGREGOR, K.** Moraxella catarrhalis: Clinical significance, antimicrobial susceptibility and BRO beta-lactamases. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. Vol. 17(4). Australia-Oceanía. Springer Verlag. 1998. pp. 219-234.

**MÉNDEZ, A.** Aguas termales. [en línea]. 2010. [Consulta: 2014/10/21]

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

**MERITXELL.** Aguas Termales. [en línea]. 2013. [Consulta: 2014/10/20]

Disponible en: <http://blog.hola.com/farmaciameritxell/2013/08/aguas-termales.html>

**MICROGEN BIOPRODUCTS LIMITED**, 1 Admiralty Way, Camberley Surrey GU15 3DT UK. . [en línea]. 2010. [Consulta: 2014/05/10]

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

**MOLINA, J.** *Termalismo Antiguo en los Balnearios del Siglo XIX*. Peréx Agorreta M. (edt.), Termalismo antiguo (I Congreso Peninsular. Actas). Madrid-España. UNED-CV. 1997. p. 79.

**MORA A, Darner.** Criterios microbiológicos para evaluar la calidad del agua en sus diferentes usos. *Revista Costarricense de Salud Pública*. San José-Costa Rica. Binasss. 1989. p. 29.

**MOURELLE, M.** *Aspectos Físicos y Químicos del Termalismo*. Barcelona-España. Universidad de Vigo. 2007. pp. 8-10.

**MOURELLE, Ma. Lourdes., et al.** *Técnicas hidrotermales y estética del bienestar*. Madrid-España. Paraninfo. 2009. p. 350.

**MOYA, V., et al.** Aguas termales. [en línea]. 2006. [Consulta: 2014/10/17]

Disponible en: <http://nonoturistico.galeon.com/aguastermales.htm>

**N.C. 93-01-218.** *Norma Cubana de Agua Mineral., Oficina Nacional de Normalización*. La Habana-Cuba. 1995. p. 8.

**NAGEL, C.** Elementos del Clima: Temperatura, Humedad, Precipitaciones, Presión y Vientos., El Universo y La Tierra. Buenos Aires-Argentina. Enciclopedia Temática MARRED COLOR s.f. p 354.

**NORMA DE CALIDAD AMBIENTAL Y DE DESCARGA DE EFLUENTES: RECURSO AGUA.** Libro VI, Anexo 1. República del Ecuador. Quito-Ecuador. p. 340.

**PALADINES, A.** Aguas termales, minerales y naturales de manantial en el Ecuador. Geología y Recursos Ecuador. Quito-Ecuador. 2011. p. 403.

**PASCUAL ANDERSON, M., et al.** Recuento de microorganismos aerobios mesófilos (31+/- 1 °C) revivificables. Microbiología Alimentaria: Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas. 2a ed. Madrid-España. Díaz de Santos. 2000. pp. 13-15.

**PERCIVAL, et al.** Biofilm development on stainless steel in mains water. Vol. 32(1). Madrid-España. Elsevier. 1998. pp. 243–253.

**PÉREX AGORRETA, Ma. Jesús.** *Termalismo Antiguo*. Universidad nacional de educación a distancia. (I congreso Peninsular. Actas). Madrid-España. Casa de Velásquez. 1997. p 79.

**PERILLA, Mindy. J., et al.** Manual de Laboratorio para la Identificación y Prueba de Susceptibilidad a los Antimicrobianos de Patógenos Bacterianos de Importancia para la Salud Pública en el Mundo en Desarrollo. Manual para la Identificación y Prueba de Susceptibilidad a los Antimicrobianos. Atlanta-Estados Unidos. Public Health Publications. 2003. pp. 1-20.

**REAL DECRETO 1074/2002**, de 18 de Octubre, por el que se regula el proceso de elaboración, circulación y comercio de aguas de bebida envasadas. Las Aguas Minerales en la Normativa Vigente. Barcelona-España. Aecosan. 2002. pp. 26-39.

**RODÉS, B.** *Control de Calidad de las Aguas Minero Medicinales*. Panorama actual de las aguas minerales y minero-medicinales en España. Barcelona-España. Instituto Tecnológico GeoMinero. 2000. pp. 75-86.

**RODRÍGUEZ CAVALLINI, E.** Tinción de Gram. Bacteriología General: Principios Y Prácticas de Laboratorio. San José-Costa Rica. Universidad de Costa Rica. (s.f.). pp. 63-64.

**RODRÍGUEZ, Evelyn., et al.** Pruebas de identificación para bacterias Gram negativas aerobias y facultativas. Bacteriología General: Principios Y Prácticas de Laboratorio.. San José-Costa Rica. Universidad de Costa Rica. 2005. p. 275.



**RYAN, et al.** Genotypic and phenotypic diversity of *Ralstonia pickettii* and *Ralstonia insidiosa* isolates from clinical and environmental sources including High-purity Water. Diversity in *Ralstonia pickettii*. Limerick-Irlanda. University of Limerick. 2011. pp. 1-11.

**RYAN. M, PEMBROKE. J, ADLEY. C.** *Ralstonia pickettii*: a persistent Gram-negative nosocomial infectious organism. Vol. 62(3). Madrid-España. Elsevier. 2005. pp 278–284.

**SAN JOSÉ ARANGO, C.** Hidrología médica y terapias complementarias. Sevilla- España. Universidad de Sevilla. 2001. p. 245.

**SAN MARTÍN BACAICOA, J.** Piscinas de tratamiento: higiene y control. Madrid- España. Complutense. (s.f.). p. 10.

**SAN MARTÍN, J., &ARMIJO, M.** "El azufre en las aguas mineromedicinales: aguas sulfatadas y aguas sulfuradas". Curas Balnearias y Climáticas. Talasoterapia y Helioterapia. Madrid-España. Complutense. 1994. pp. 243-256.

**SAN MIGUEL DE LA CAMARA, Maximino.** Geoquímica de las Aguas Termales. Madrid-España. Instituto de España Real Academia de la Medicina. 1956. pp. 26-40.

**SANTAMARÍA, M. P., et al.** Biología y Botánica. Vol. 2. Valencia-España. Universidad Politécnica de Valencia. 1997. p. 87.

**SINIESTERRA, J. V.** Microorganismos extremófilos. Grupo de Biotransformación. Facultad de Farmacia. Madrid-España. Complutense. 1998. p. 49.

**TERMA.** [en línea]. 2007. [Consulta: 2014/11/28]

Disponible en: <http://www.definicionabc.com/general/terma.php>

**TORELLA MATEU, Fransisco.** La sulfuraria de baños de Montemayor (Cáceres): características morfológicas y funcionales de la comunidad microbiana constituyente. Vol. 1. Madrid-España. Anales de hidrología médica. 2006. pp. 61-78.

**TORTORA, G., eta al.** Crecimiento Microbiano. Introducción a la microbiología. Panamá-Panamá. Médica Panamericana. 2007. pp. 159-160.

**VENDRELL, M. C., et al.** Estudio de microorganismos patógenos en la fuente Termal de O Tinteiro en Ourense. Vol. 2. Ourense-España. Ciencia y Tecnología Alimentaria. 1998. pp. 92-95.

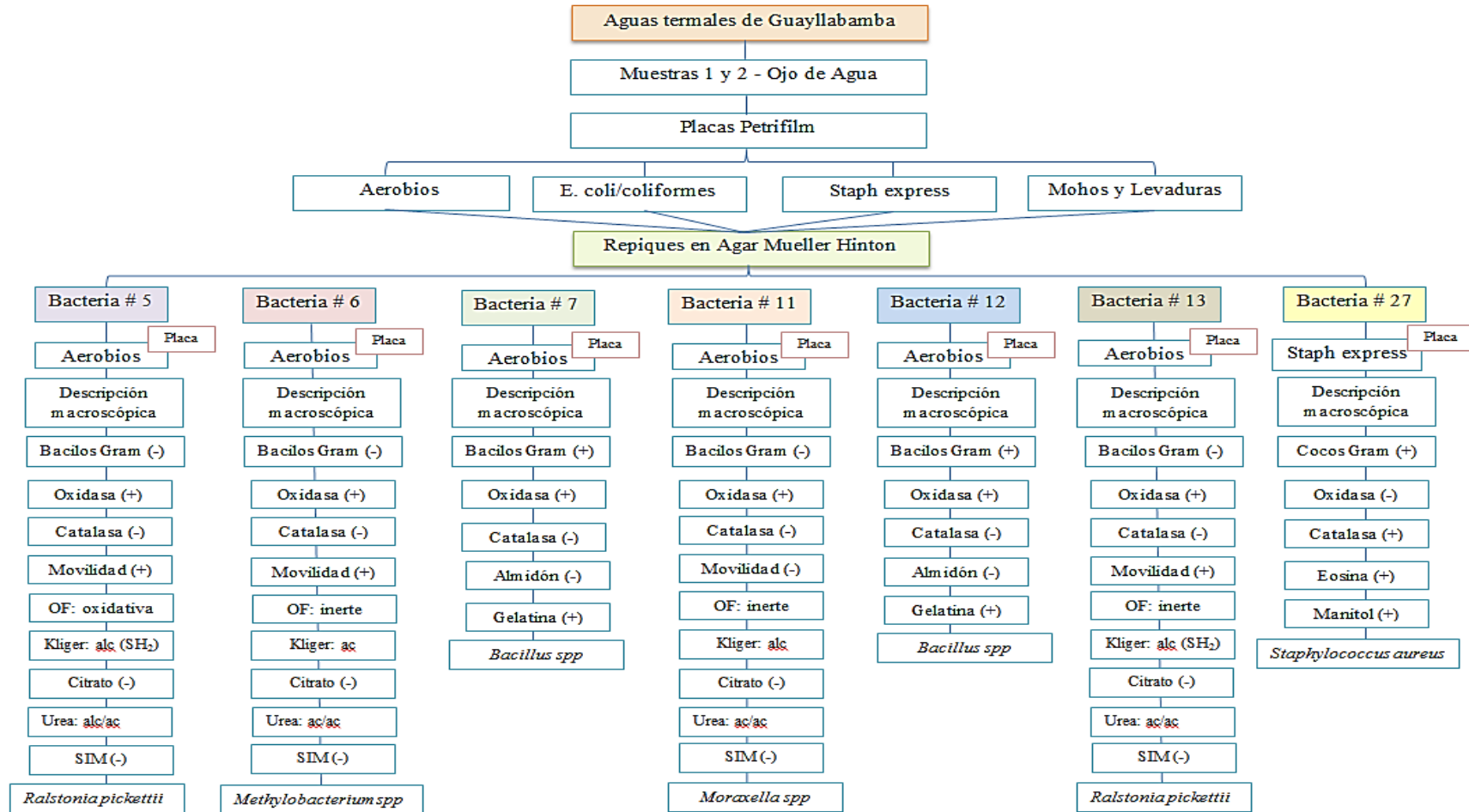
**YUNGÁN, José.** Estudio de la calidad de agua en los afluentes de la microcuenca del Rio Blanco para determinar las causas de la degradación y alternativas de manejo. (Tesis). (Ing. Agrónomo). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Escuela de Agronomía. Facultad de Recursos Naturales. Riobamba-Ecuador. 2010. pp. 20-57.

**YUPANQUI, E.** Análisis Físicoquímico de Fuentes de Aguas Termominerales del Callejón de Huaylas. (Tesis). (Magister en Química). Pontificia Universidad Católica de Perú. Escuela de Posgrado. Escuela de Ingeniería Química. Lima-Perú. 2006. pp. 90-124.

**ZÚÑIGA, A., et al.** Microbiología sanitaria. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. Vol. 48(2). Ciudad de México-México. Medigraphic, 2006. pp. 226-230.

# ANEXOS

## Anexo A: Esquema de Identificación Bacteriana de las Aguas termales de Guayllabamba



**Anexo B:** Balneario Aguas termales de Guayllabamba



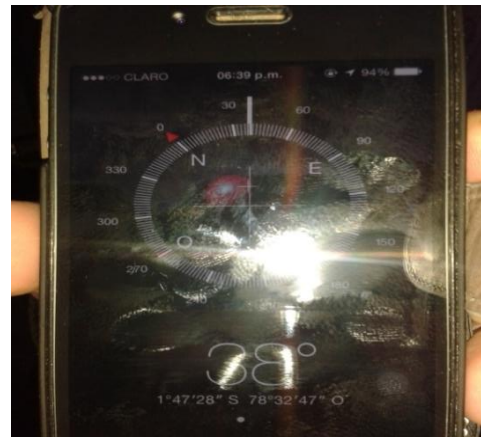
**Anexo C:** Punto de emergencia del Agua termal de Guayllabamba



**Anexo D.** Multiparámetro utilizado para medir los parámetros fisicoquímicos del Agua termal



**Anexo E.** Instrumento utilizado para medir las coordenadas geográficas del lugar



**Anexo F.** Medición de Parámetros fisicoquímicos en el punto de emergencia



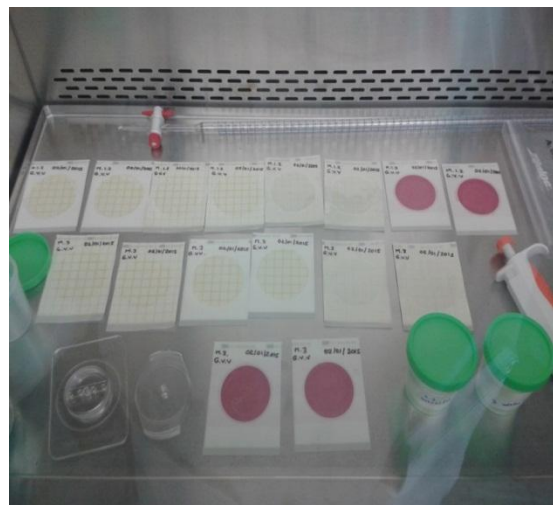
**Anexo G.** Recolección de la muestra de agua



**Anexo H.** Cámara de Flujo utilizada para la realización de este estudio



**Anexo I.** Placas Petrifilm usadas para el estudio microbiológico





**Anexo J. Placas Petrifilm a las 48 horas de incubación**

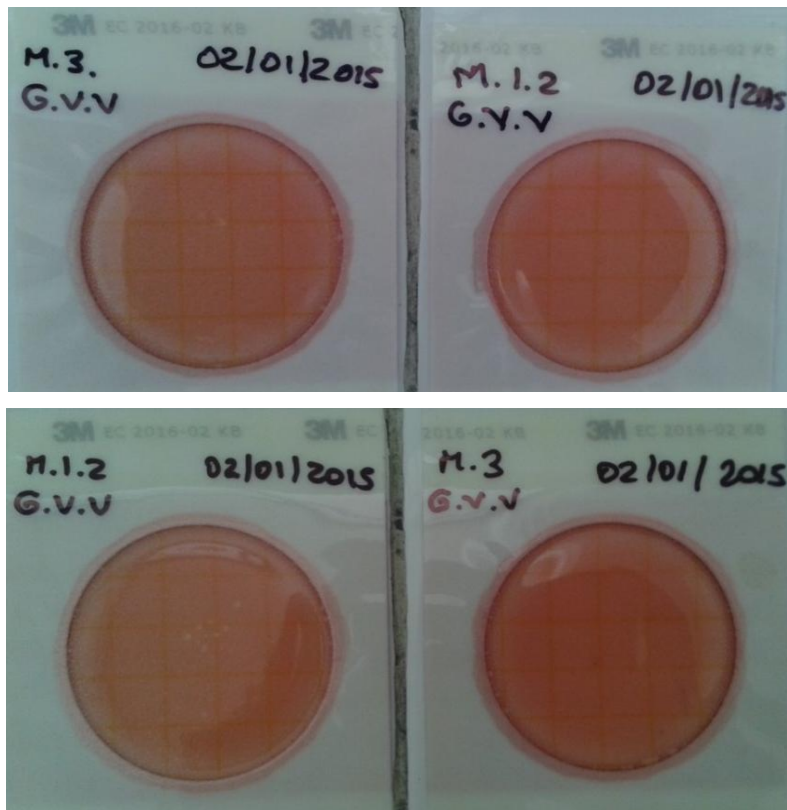
Petrifilm Staph Express (Proporciona recuentos de *Staphylococcus aureus*)



**Petrifilm para Recuento de Aerobios**



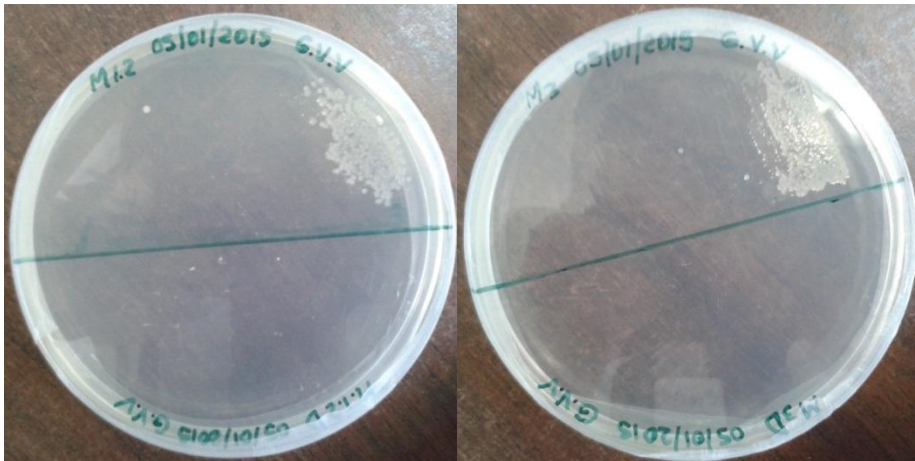
Petrifilm para *E. coli*/Coliformes



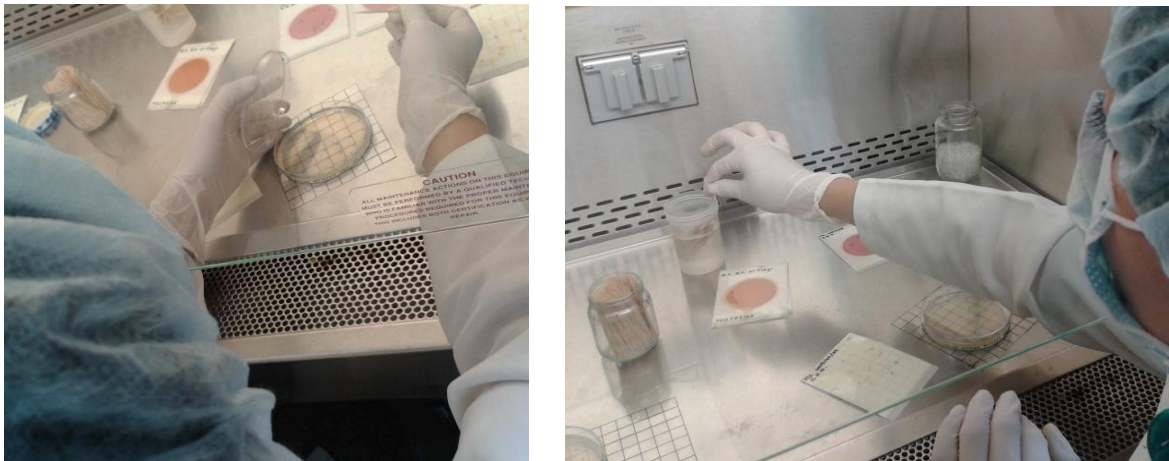
Petrifilm para para recuento de Mohos y Levaduras



**Anexo K. Siembra en MuellerHinton**



**Anexo L. Purificación de los aislados bacterianos**



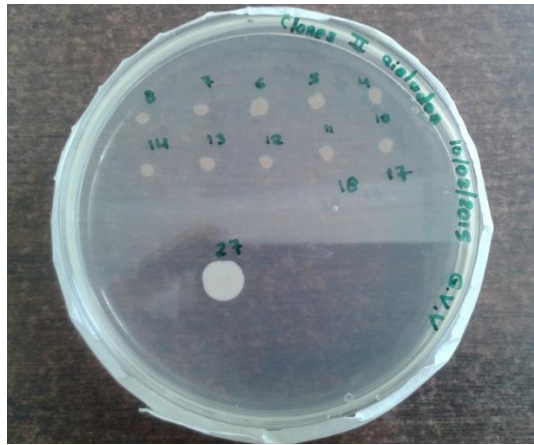
**Anexo M. Aislados bacterianos**

**Primer aislamiento**

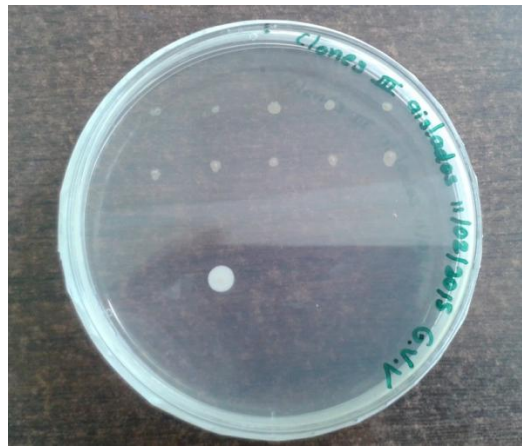




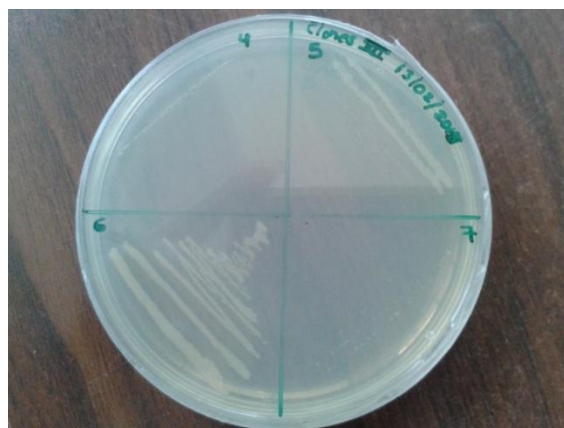
Segundo aislamiento

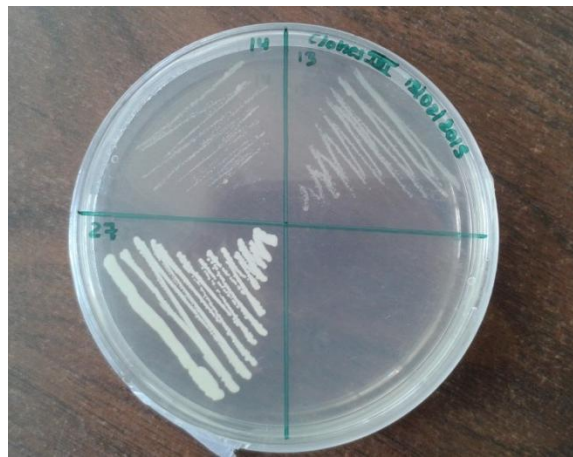
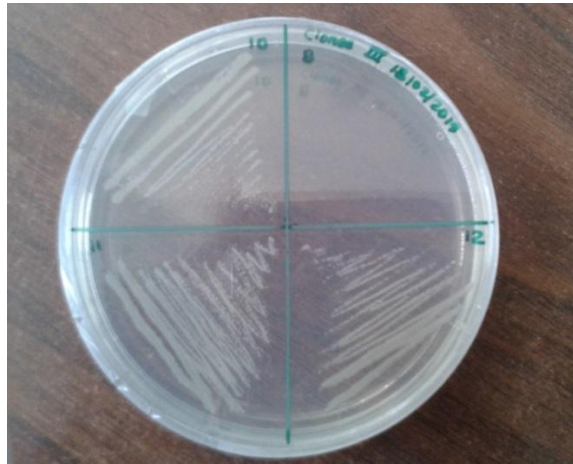


Tercer aislamiento

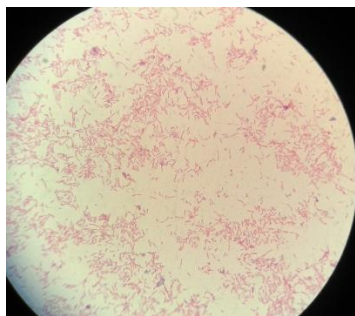


Anexo N. Obtención de cultivos puros

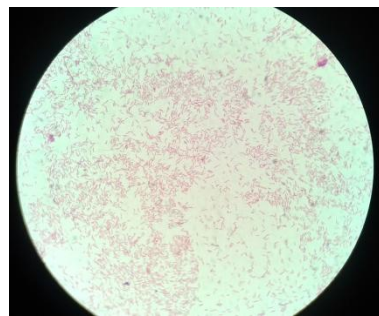




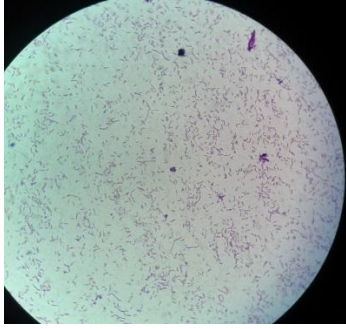
**Anexo O. Tinción Gram de las colonias bacterianas aisladas y purificadas**



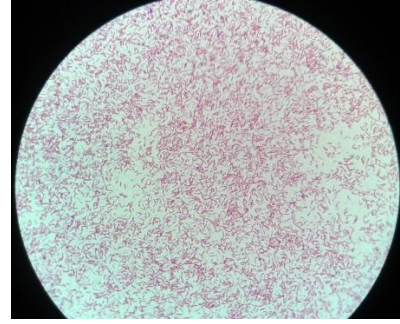
Bacteria #5



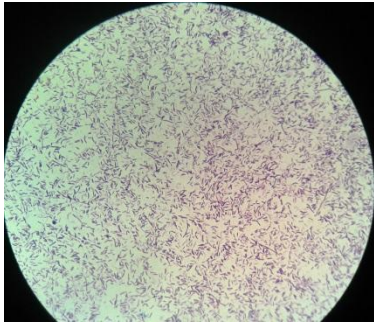
Bacteria #6



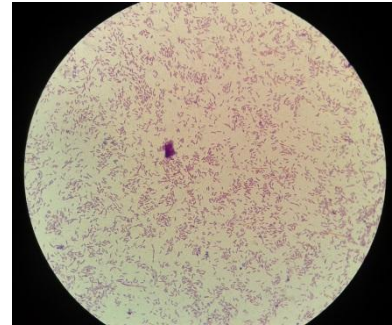
Bacteria #7



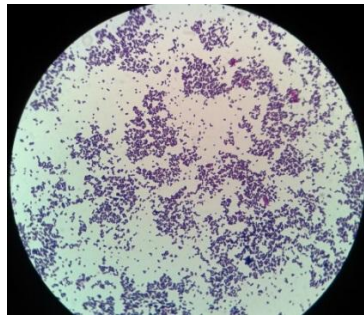
Bacteria #11



Bacteria #12



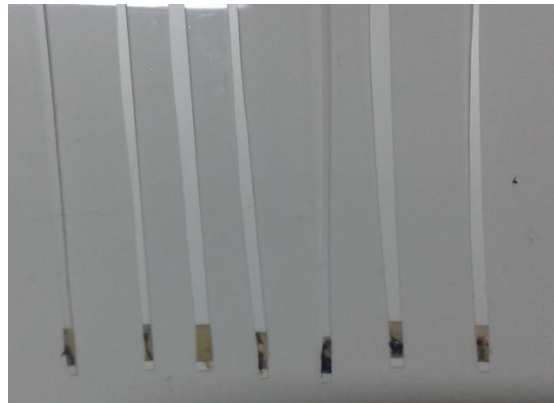
Bacteria #13



Bacteria #27

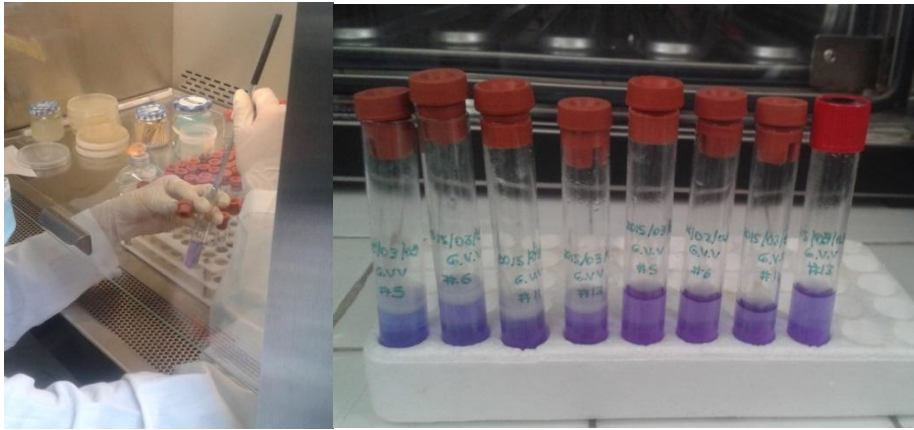
## Anexo P. Pruebas bioquímicas

### Citocromo oxidasa

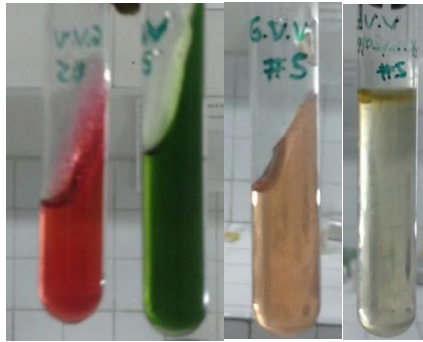




## Oxidación y fermentación (OF)



## Pruebas de Kligler, Citrato, Urea, SIM

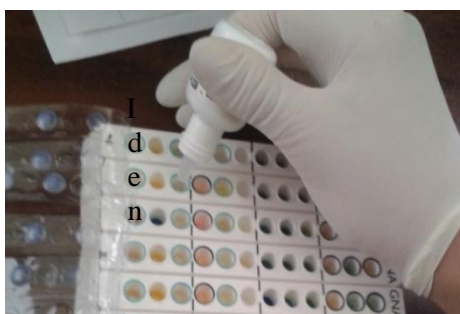


## Anexo Q. Sistema de Microgen

### Inoculación e Incubaciones



### Lectura y adición de reactivos



# Tificación

**GN-ID A+B PANEL REPORT FORM**

Lab. No. \_\_\_\_\_ Specimen Type: *GVV 11 Vanesa Veintimilla*  
 Date: *2015/05/09*

Well Number	G N A wells												G N B wells															
	Oxidase	Motility	Nitrate	Lysine	Ornithine	H2S	Glucose	Mannitol	Mucosa	ONPG	Indole	Urease	VP	Citrate	TDA	Gelatin	Malonate	Inositol	Sorbitol	Phenolose	Sucrose	Lactose	Arabinose	Adonitol	Raffinose	Salicin	Arginine	
Reaction	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	(?)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Result	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	
Reaction Index	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	
Sum of Positive Reactions	5			4			0			0			5			4				0		0					0	

Octal Code: \_\_\_\_\_ Final Identification: \_\_\_\_\_

WFE125-06/02

## Informedel Software Microgen Identification System (MID-60)

**Microgen ID**

### Microgen GNA + B Oxidase Positive

---

**Specimen Details**

Lab Ref.: *GVV11* Date: \_\_\_\_\_  
 Name: *VANESA VEINTIMILLA*  
 Specimen Type: \_\_\_\_\_  
 Source (ward/location): \_\_\_\_\_

---

**Results Entry**

Octal Code: *540050000*

+ OXI Oxidase	- MOT Motility	+ NIT Nitrate Reduction
+ LYS Lysine Decarboxylase	- ORN Ornithine Decarboxyl	- H2S H2S Production
- GLU Acid from Glucose	- MAN Acid from Mannitol	- XYL Acid from Xylose
- ONP ONPG	- IND Indole	- UR Urea Hydrolysis
+ VP Voges Proskauer	- CIT Citrate Utilization	+ TDA Tryptophan Deaminase
- GEL Gelatin Liquefaction	- MAL Malonate Inhibition	- INO Acid from Inositol
- SOR Acid from Sorbitol	- RHA Acid from Rhamnose	- SUC Acid from Sucrose
- LAC Acid from Lactose	- ARA Acid from Arabinose	- ADO Acid from Adonitol
- RAF Acid from Raffinose	- SAL Acid from Salicin	- ARG Arginine Dihydrolase

---

**Identification Analysis**

	<i>Moraxella spp.</i>	<i>V.alginolyticus</i>	<i>A.faecalis type 11</i>	<i>V.damsela/ P.damsela</i>	<i>A.xylooxidans</i>
Select ID Choice	Yes	No	No	No	No
Probability	1/17,347,838	<1/100,000,000	<1/100,000,000	<1/100,000,000	<1/100,000,000
Percent Probability	81.29%	13.93%	2.97%	1.47%	0.24%
Likelihood	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%
Human Isolate	Yes	Yes	No	Yes	Yes
Tests against					
Test 1	VP (0.1%)	MOT (99.9%)	VP (0.1%)	GLU (99.9%)	MOT (99.9%)
Test 2	TDA (0.1%)	TDA (0.1%)	TDA (0.1%)	TDA (0.1%)	VP (0.1%)
Test 3			MOT (91%)	ARG (95%)	TDA (0.1%)
Additional Tests	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Ferment of Glucose	0.1%	99.9%	0.1%	99.9%	0.1%
Growth on SS Agar	0.1%	77%	78%	0%	98%
Growth on MacConkey	70%	99.9%	99.9%	0%	99.9%
Growth in 0% NaCl	43%	0.1%	99.9%	0.1%	99.9%
Growth at 42C	24%	27%	75%	0%	84%
Additional Comments			2	12	1

1 Previously *Alcaligenes xylooxidans*. Microbiol Immunol (1998) 42: 429 - 438  
 2 Previously *A.faecalis*. Usually isolated from the environment  
 12 Int. J. Syst. Bacteriol. (1991) 41:529 - 534

---

**Identification Comments**

Acceptable identification of *Moraxella* spp.  
 The strain is not typical (multiple tests are against), although it is well separated from other suggested identification choices  
 ADDITIONAL TESTS MAY IMPROVE THE IDENTIFICATION.