



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

**“ESTUDIO MICROBIOLÓGICO DE LAS AGUAS TERMALES
DEL BALNEARIO TURÍSTICO YANAYACU UBICADO EN EL
CANTÓN LA TRONCAL PERTENECIENTE A LA PROVINCIA DE
CAÑAR”**

Trabajo de titulación presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

AUTORA: YESENIA ELIZABETH RAMOS GUAYLLASACA

TUTOR: DR. GERARDO EMILIO MEDINA RAMÍREZ

Riobamba – Ecuador

2015

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

El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que: El trabajo de investigación: “**ESTUDIO MICROBIOLÓGICO DE LAS AGUAS TERMALES DEL BALNEARIO TURÍSTICO YANAYACU UBICADO EN EL CANTÓN LA TRONCAL PERTENECIENTE A LA PROVINCIA DE CAÑAR**”, de responsabilidad de la señorita Yesenia Elizabeth Ramos Guayllasaca, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Titulación, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Dr. Gerardo Medina
DIRECTOR DEL
TRABAJO DE TITULACIÓN

Dr. Félix Andueza
MIEMBRO DE TRIBUNAL

DOCUMENTALISTA
SISBIB ESPOCH

NOTA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Yesenia Elizabeth Ramos Guayllasaca, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en este Trabajo de Titulación y el patrimonio intelectual del Trabajo de Titulación, pertenece a la Escuela Superior Politécnica De Chimborazo.

YESENIA ELIZABETH RAMOS GUAYLLASACA

DEDICATORIA

EL presente trabajo de titulación quiero dedicar a Dios por darme la sabiduría y salud necesaria para cumplir con todo los propósitos en mi vida.

A mis padres por todo su amor, comprensión, ejemplo de constancia, trabajo, dedicación y honestidad, este logro también es de ustedes.

A mis hermanos por su apoyo incondicional por compartir conmigo momentos de alegría y tristeza.

A mis demás familiares por su comprensión, palabras de aliento y ayuda constante.

A mi angelita como le digo yo, mi prima que físicamente no está pero me dejó la mayor lección de vida luchar hasta el final sin dejar de sonreír.

Yesenia.

AGRADECIMIENTO

A Dios por darme la sabiduría y fuerzas necesarias para superar los obstáculos a lo largo de toda mi vida.

Al templo del saber a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, a la Escuela de Bioquímica y Farmacia de manera especial a mis docentes por toda sus conocimientos y valores transmitidos a lo largo de mi formación claves para ejercer la profesión con ética y responsabilidad.

A mis padres por ser los pilares fundamentales en mi vida por su paciencia y ayuda incondicional.

A mis hermanos y demás familiares por sus palabras de aliento, confianza y paciencia.

A la Sra. Yolanda Peralta Veintimilla una de las herederas del Balneario de aguas termales Yanayacu por su predisposición para la realización de este trabajo de investigación

Un agradecimiento especial al Dr Gerardo Medina director del trabajo de investigación y al Dr Félix Andueza por el apoyo incondicional, paciencia y ayuda por todo su esfuerzo, conocimiento, tiempo y dedicación que han empleado a este trabajo de investigación.

A las Doctoras Sandra, Aída, Patricia e Isabel por sus conocimientos, orientación y sabiduría transmitidos.

A mis amigos y amigas a lo largo de mi vida estudiantil por su apoyo constante y ayuda incondicional para no perder el ánimo y culminar esta etapa de mi vida.

A todas aquellas personas que aportaron de una u otra manera para la culminación exitosa de mi trabajo de investigación.

A todos un mil gracias.

Yesenia.

INDICE GENERAL

CONTENIDO		Páginas
RESUMEN.....		xvii
SUMARY.....		xviii
INTRODUCCIÓN.....		1
CAPITULO I		
1	MARCO TEÓRICO REFERENCIAL	2
1.1.	Aguas Termales	2
1.1.1	<i>Definiciones</i>	2
1.1.2	<i>Origen de las Aguas Termales</i>	3
1.1.2.1	<i>Geotérmicas</i>	3
1.1.2.2	<i>Magmáticas</i>	3
1.1.3	<i>Clasificación de las Aguas Termales</i>	3
1.1.3.1	<i>Con relación a la temperatura</i>	3
1.1.3.2	<i>Según su tonicidad</i>	4
1.1.3.3	<i>De acuerdo a su composición mineral</i>	4
1.1.3.4	<i>De acuerdo a su actividad terapéutica</i>	5
1.2	Balneario Termal	6
1.2.1	<i>Balneario Termal Yanayacu</i>	6
1.2.1.1	<i>Localización</i>	6
1.2.1.2	<i>Descripción</i>	6
1.3	Características microbiológicas de las aguas termales	7
1.4	Análisis Microbiológico de las Aguas termales	8
1.5	Crecimiento Microbiológico	9
1.5.1	<i>Temperatura</i>	9
1.5.2	<i>Requerimientos de Oxígeno</i>	10
1.5.3	<i>Metabolismo</i>	10
1.5.4	<i>Presión Osmótica</i>	10
1.5.5	<i>Medios de cultivo</i>	11
1.5.1.1	<i>Medios usuales</i>	11
1.5.1.2	<i>Medios enriquecidos</i>	11
1.5.1.3	<i>Medios de aislamiento</i>	11
1.5.1.4	<i>Medios Selectivos</i>	11

1.5.1.5	<i>Medios de Enriquecimiento</i>	12
1.5.1.6	<i>Medios Selectivos.-Diferenciales</i>	12
1.6	Morfología y agrupaciones de los microorganismos	12
1.6.1	<i>Morfología</i>	12
1.6.2	<i>Agrupaciones</i>	12
1.7	Características Morfológicas de las Colonias Bacterianas	13
1.8	Identificación Microbiana	14
1.8.1	<i>Tinción Gram</i>	14
1.8.1.1	<i>Pared celular de las Bacterias Gram positivas</i>	15
1.8.1.2	<i>Pared celular de las Bacterias Gram negativas</i>	15
1.8.2	<i>Oxidasa</i>	16
1.8.3	<i>Catalasa</i>	17
1.8.4	<i>Óxido Fermentación OF (Prueba de Hugh y Leifson</i>	17
1.8.5	<i>Hidrólisis del Almidón</i>	18
1.8.6	<i>Hidrólisis de la Gelatina</i>	19
1.8.7	<i>Pruebas Bioquímicas</i>	19
1.8.7.1	<i>Agar Hierro de Kligler (KIA)</i>	19
1.8.7.2	<i>Agar Citrato (Simmons)</i>	20
1.8.7.3	<i>Agar Urea</i>	21
1.8.7.4	<i>Agar SIM</i>	22
1.8.8	<i>Placas Petrifilm</i>	24
1.8.9	<i>Sistemas comerciales manuales o galerías multiprueba para identificación de microorganismos</i>	25
1.8.9.1	<i>Sistema Miniaturizado para identificación de cepas (Microgen GN-ID)</i>	25
1.9	Microorganismos frecuentes de las aguas termales	26
1.9.1	<i>Pseudomonas</i>	26
1.9.1.1	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	28
1.9.1.2	<i>Pseudomona stutzeri</i>	29
1.9.2	<i>Staphylococcus</i>	30
1.9.2.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	30
1.9.3	<i>Enterococcus</i>	32
1.9.4	<i>Shewanella</i>	34
1.9.4.1	<i>Shewanella putrefaciens</i>	36
1.9.5	<i>Aeromonas</i>	36
1.9.6	<i>Brevundimonas</i>	38

1.10	Técnicas de estudio de sensibilidad a los antimicrobianos	39
1.10.1	<i>Mecanismo de resistencia antimicrobiana</i>	39

CAPITULO II

2	MARCO METODOLÓGICO	40
2.1	Lugar de Investigación	40
2.2	Unidad de Análisis	40
2.3	Factores de Estudio	40
2.4	Tamaño de la muestra	40
2.5	Materiales, Equipos, Reactivos	40
2.6	Métodos y Técnicas	43
2.6.1	<i>Muestreo</i>	43
2.6.2	<i>Análisis Físico-Químico</i>	43
2.6.3	<i>Análisis Microbiológico</i>	43
2.6.3.1	<i>Recuento de bacterias aerobias mesófilas, E.coli/coliformes, Staphylococcus aureus, mohos y levaduras por el método de placas con película secas rehidratables petrifilm</i>	43
2.6.3.2	<i>Descripción macroscópica de los aislados bacterianos</i>	44
2.6.3.3	<i>Estabilización del aislado bacteriano</i>	44
2.6.3.4	<i>Siembra por agotamiento para la obtención de clones puros</i>	45
2.6.3.5	<i>Tinción Gram de las colonias aisladas</i>	45
2.6.3.6	<i>Prueba de la Oxidasa</i>	45
2.6.3.7	<i>Prueba de la Catalasa</i>	46
2.6.3.8	<i>Oxido fermentación</i>	46
2.6.3.9	<i>Movilidad</i>	47
2.6.3.10	<i>Pruebas utilizadas para la identificación de Bacilos Gram Positivos</i>	47
2.6.3.11	<i>Pruebas utilizadas para la identificación de Bacilos Gram Negativos</i>	48
2.6.4	<i>Pruebas de sensibilidad Antimicrobiana</i>	52
2.6.5	<i>Prueba Fenotípica para la determinación de Metalo β-Lactamasas</i>	52

CAPITULO III

3	MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	61
----------	--	----

3.1	Parámetros <i>in situ</i>	61
3.2	Recuento de Aerobios Mesófilos	62
3.3	Recuento de <i>Escherichia coli</i>/coliformes	64
3.4	Recuento de <i>Staphylococcus</i> (UFC/mL)	67
3.5	Recuento de mohos y levaduras	69
3.6	Morfología macroscópica de las colonias bacterianas obtenidas de las aguas termales del balneario Yanayacu	71
3.7	Bacilos gram negativos, cocos y bacilos gram positivos aislados del Balneario Yanayacu	72
3.8	Identificación de los Clones puros Aislados	75
3.9	Especies Identificadas de las Aguas Termales del Balneario Yanayacu	78
3.10	Determinación de la resistencia /sensibilidad a antibióticos de los aislados bacterianos identificados en el presente estudio	81
3.10.1	<i>Antibiograma de la especie <i>Pseudomona aeruginosa</i> identificada en las aguas termales del Balneario Yanayacu</i>	81
3.10.2	<i>Antibiograma de los bacilos gram negativos aislados e identificados de las aguas termales del Balneario Yanayacu</i>	82
3.10.3	<i>Antibiograma de los cocos gram positivos aislados e identificados de las aguas termales del Balneario Yanayacu</i>	83
3.10.4	<i>Antibiograma de los cocos gram positivos identificados como <i>Enterococcus flavescens</i> de las aguas termales del Balneario Yanayacu</i>	84
3.10.5	<i>Antibiograma del género <i>Bacillus spp</i> aislado de las aguas termales del Balneario Yanayacu</i>	85
3.11	Presencia fenotípica de metalo β-lactamasas en clones gram negativos identificados de las Aguas Termales del Balneario Yanayacu	86
	CONCLUSIONES	87
	RECOMENDACIONES	88
	BIBLIOGRAFÍA	
	ANEXOS	

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ESPOCH	Escuela Superior Politécnica de Chimborazo
°C	Grados Celsius
G	Gramos
Kg	Kilogramo
CO₂	Dióxido de carbono
FAO	Food and Agriculture Organization
OMS	Organización Mundial de la Salud
mg/L	miligramo/litro
g/L	gramo/litro
mmol/L	milimol/litro
Meq	Miliequivalente
µm	Micrómetro
Mm	Milímetros
OF	Óxido-Fermentación
KIA	Agar Hierro Kligler
H₂S	Ácido sulfhídrico
H₂O	Agua
ATP	Adenosín Trifosfato
UFC	Unidades Formadoras de colonias
NO₃	Nitrato
Fc	Fragmento
IgG	Inmunoglobulina G
SAMR	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
TSI	Agar Triple Azúcar Hierro
MI	Mililitros
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
INAMHI	Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología
pH	Potencial de Hidrógeno
SIM	Sulfhídrico Indol Movilidad
Cm	Centímetros

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1-1	Beneficios de Aguas Termales para el organismo en relación a su composición química.....	5
Cuadro 2-1	Características morfológicas de las colonias bacterianas.....	13
Cuadro 3-1	Interpretación de la prueba de Hugh y Leifson OF.....	18
Cuadro 4-1	Pruebas Bioquímicas para Identificación del Género <i>Aeromonas</i>	37
Cuadro 5-1	Pruebas Bioquímicas para Identificación de especies del Género <i>Aeromonas</i>	37
Cuadro 6-1	Pruebas bioquímicas para la identificación de especies del género <i>Brevundimonas</i>	38
Cuadro 7-2	Materiales de Laboratorio.....	41
Cuadro 8-2	Equipos.....	41
Cuadro 9-2	Reactivos.....	42
Cuadro 10-2	Medios de Cultivo.....	42
Cuadro 11- 2	Características macroscópicas de los aislados bacterianos.....	44
Cuadro 12-2	Interpretación de los resultados en la prueba SIM.....	51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1	Clasificación de las Aguas Termales de acuerdo a su temperatura según Gramova 1994.....	3
Tabla 2-1	Clasificación de las aguas de acuerdo a su temperatura según Armijo y San Martín 1994.....	4
Tabla 3-1	Clasificación de las aguas según Karakolev 1987 atendiendo a su tonicidad.....	4
Tabla 4-1	Clasificación de las aguas de acuerdo a su composición mineral según Armijo 1994.....	5
Tabla 5-1	Microorganismos en relación a la temperatura óptima de crecimiento.....	9
Tabla 6-2	Componentes y preparación del Medio Hugh-Leifson.....	46
Tabla 7-2	Composición y preparación del Agar Movilidad.....	47
Tabla 8-2	Composición y preparación del Agar utilizado para la hidrólisis del almidón.....	47
Tabla 9-2	Composición y preparación del Agar utilizado para la hidrólisis de la Gelatina.....	48
Tabla 10-2	Composición y preparación del Agar King B.....	49
Tabla 11-3	Determinación de parámetros <i>in situ</i> del Manantial Termal del Balneario “Yanayacu” ubicado cantón la Troncal provincia de Cañar.....	61
Tabla 12-3	Recuento de Aerobios Mesófilos (UFC/mL) de las Aguas Termales del Balneario Yanayacu ubicado en el cantón La Troncal provincia de Cañar.....	62
Tabla 13-3	Recuento de <i>Escherichia coli</i> /coliformes (UFC/mL) de las Aguas Termales del Balneario Yanayacu ubicado en el cantón La Troncal provincia de Cañar.....	64
Tabla 14-3	Recuento de <i>Staphylococcus</i> (UFC/mL) de las Aguas Termales del Balneario Yanayacu ubicado en el cantón La Troncal provincia de Cañar.....	67
Tabla 15-3	Recuento de Mohos y Levaduras (UFC/mL) de las Aguas Termales del Balneario Yanayacu.....	69

Tabla 16-3	Características macroscópicas de las colonias bacterianas aisladas de las aguas Termales del balneario Yanayacu.....	71
Tabla 17-3	Número de Bacilo Gram Negativos, Cocos y Bacilos Gram Positivos aislados del Balneario Yanayacu.....	72
Tabla 18-3	Número de bacilos gram negativos, cocos y bacilos gram positivos aislados del Balneario Yanayacu para su identificación.....	74
Tabla 19-3	Pruebas bioquímicas de los clones puros bacilos gram negativos aislados del Balneario Yanayacu.....	75
Tabla 20-3	Pruebas bioquímicas de los clones puros bacilos y cocos gram positivos del Balneario Yanayacu.....	76
Tabla 21-3	Especies identificadas de los dos puntos donde emergen las aguas termales del Balneario Yanayacu.....	78
Tabla 22-3	Antibiograma obtenido al evaluar el aislado bacteriano identificado como <i>Pseudomona aeruginosa</i>	81
Tabla 23-4	Antibiograma Bacilos Gram Negativos.....	82
Tabla 24-4	Antibiograma de la especie <i>Staphylococcus aureus</i> aisladas de las aguas termales del Balneario Yanayacu.....	83
Tabla 25-3	Antibiograma de la especie <i>Enterococcus flavescens</i> aislada de las aguas termales del Balneario Yanayacu.....	84
Tabla 26-4	Antibiograma del género <i>Bacillus spp</i> aislado de las aguas termales del Balneario Yanayacu.....	85
Tabla 27-3	Presencia fenotípica de metalo β -lactamasas en clones aislados puros gram negativos de las Aguas Termales del Balneario Yanayacu localizado en el cantón la Troncal Provincia de Cañar.....	86

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1-1	Mapa de ubicación del Balneario Termal Yanayacu (La Troncal-Cañar).....	6
Figura 2-1	Balneario Termal “Yanayacu” (La Troncal-Cañar).....	7
Figura 3-1	Morfología y agrupaciones de los microorganismos.....	13
Figura 4-1	Tinción Gram.....	14
Figura 5-1	Prueba Oxidasa.....	16
Figura 6-1	Prueba de la Catalasa.....	17
Figura 7-1	Prueba Oxido Fermentación OF.....	17
Figura 8-1	Prueba hidrólisis del almidón.....	18
Figura 9-1	Prueba hidrólisis de la gelatina.....	19
Figura 10-1	Agar hierro de Kligler (KIA).....	20
Figura 11-1	Agar Citrato (Simmons).....	20
Figura 12-1	Productos del metabolismo del citrato.....	21
Figura 13-1	Productos de metabolismo del citrato en dependencia del pH del medio.....	21
Figura 14-1	Agar Urea.....	21
Figura 15-1	Agar SIM producción de ácido sulfhídrico.....	22
Figura 16-1	Reacción global de la producción de ácido sulfhídrico.....	23
Figura 17-1	Agar SIM prueba Indol.....	23
Figura 18-1	Reacción de la producción de indol.....	23
Figura 19-1	Prueba de movilidad agar SIM.....	24
Figura 20-1	Placas Petrifilm.....	25
Figura 21-1	Colonia de <i>Pseudomona aeruginosa</i>	28
Figura 22-1	Colonia de <i>Pseudomona stutzeri</i>	29
Figura 23-1	Fermentación del Manitol <i>Staphylococcus aureus</i>	31
Figura 24-1	Pruebas bioquímicas diferenciales entre la especie <i>Shewanella. algae</i> y <i>Shewanella putrefaciens</i>	35
Figura 25-1	Siembra por Agotamiento.....	45
Figura 26-2	Preparación de los medios de los medios utilizados para las pruebas bioquímicas.....	49
Figura 27-2	Forma de utilización de la Galería MICROGEN™ GN-ID.....	51
Figura 28-2	Esquema de identificación de <i>Pseudomonas stutzeri</i> mediante la	

	galería MICROGEN™ GN-ID.....	53
Figura 29-2	Esquema de identificación de <i>Shewanella putrefaciens</i> mediante la galería MICROGEN™ GN-ID.....	54
Figura 30-2	Esquema de identificación de <i>Aeromonas shubertii</i> mediante pruebas bioquímicas.....	55
Figura 31-2	Esquema de identificación de <i>Brevundimonas diminuta</i> mediante pruebas bioquímicas.....	56
Figura 32-2	Esquema de identificación de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> mediante pruebas bioquímicas.....	57
Figura 33-2	Esquema de identificación de <i>Staphylococcus aureus</i>	58
Figura 34-2	Esquema de identificación de <i>Enterococcus flavescens</i>	59
Figura 35-2	Esquema de identificación de <i>Bacillus spp</i>	60

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Gráfico 1-3	Porcentaje del Recuento de Aerobios Mesófilos (UFC/mL) de las Aguas Termales del Balneario Yanayacu del cantón la Troncal provincia de Cañar.....	63
Gráfico 2-3	Recuento de <i>Escherichia coli</i> /coliformes(UFC/mL) de las Aguas Termales del Balneario Yanayacu ubicado en el cantón La Troncal provincia de Cañar.....	65
Gráfico 3-3	Recuento del género <i>Staphylococcus</i> en los dos puntos donde emergen las aguas termales del Balneario Yanayacu.....	68
Gráfico 4-3	Recuento de mohos y levaduras (UFC/mL) en dos puntos donde emergen las aguas termales del Balneario Yanayacu.....	70
Gráfico 5-3	Porcentaje de bacilos gram (-), cocos y bacilos gram (+) en las aguas termales del Balneario Yanayacu.....	73
Gráfico 6-3	Especies identificadas de los dos puntos donde emergen las aguas termales del Balneario Yanayacu.....	79

RESUMEN

El Ecuador es un país que posee una gran cantidad de fuentes termales, sin embargo muy poco se conoce de la microbiota de estas aguas es por esto que en el presente trabajó se realizó un estudio microbiológico de las aguas termales del Balneario Yanayacu (cantón la Troncal provincia de Cañar) para ello se analizó la microbiota en dos puntos donde emergen las aguas con el fin de determinar si los microorganismos presentes en ella suponen un riesgo. Se cuantificaron las bacterias aerobias mesófilas, *Escherichia coli* / coliformes, *Staphylococcus*, mohos y levaduras utilizando el método en placas 3M™ Petrifilm. En la piscina el total de aerobios mesófilos fue de $3,28 \times 10^2$ UFC/mL, coliformes de 5 UFC/mL, *Staphylococcus* de 2 UFC/mL *Staphylococcus aureus* de 1 UFC/mL no hubo presencia de *Escherichia coli*, mohos y levaduras. En la fuente el número de aerobios mesófilos fue $9,62 \times 10^2$ UFC/mL, coliformes de $7,8 \times 10^1$ UFC/ mL, *Escherichia coli* de 1 UFC/mL, *Staphylococcus* de $2,74 \times 10^2$ UFC/mL, levaduras 7,5 UFC/ mL no hubo presencia de mohos. La población bacteriana está constituida por bacilos gram negativos en un 68%, cocos gram positivos en un 20% y bacilos gram positivos en un 12%, las especies identificadas fueron: *Shewanella putrefaciens* *Pseudomonas stutzeri*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Brevundimonas diminuta*, *Bacillus spp*, *Enterococcus flavescens*, *Aeromonas schubertii*. Referente a la susceptibilidad antimicrobiana se encontró que *Pseudomonas aeruginosa* fue resistente a trimetoprim/sulfametoxazol y amoxicilina/ácido clavulánico. La única especie sensible a todos los antibióticos fue *Brevundimonas diminuta*, *Bacillus spp* mostró resistencia a la oxacilina, *Enterococcus flavescens* presentó resistencia a tres antibióticos (clindamicina, oxacilina, cefalotina). Ninguna de las especies presentaron metalo β -lactamasas. Se recomienda a los responsables del balneario realizar controles microbiológicos periódicos con el fin de evitar riesgos en la salud de los bañistas.

PALABRAS CLAVE: <AGUAS TERMALES > <BALNEARIO YANAYACU>
<MICROBIOLOGÍA > <MICROBIOTA > <BALNEARIO YANAYACU> <LA TRONCAL
[CANTÓN]> <CAÑAR [PROVINCIA]>

SUMMARY

Ecuador has a lot of hot springs, though very little is known about microbiota of these waters. That is why; in this research was carried out a microbiological study of the thermal waters at Yanayacu Spa (La Troncal, Cañar province). For this, the microbiota was analyzed in two points where waters emerge in order to determine whether the present microorganisms there in pose a risk. Aerobic mesophilic bacteria were quantified, *Escherichia coli*/coliforms, *Staphylococcus*, molds and yeasts using the method in plates 3M™ petrifilm. In the pool total aerobic mesophilic bacteria was $3,28 \times 10^2$ CFU/mL, coliforms 5 CFU/mL, *Staphylococcus* 2 CFU/mL, *Staphylococcus aureus* 1 CFU/mL, there was no presence of *Escherichia coli*, molds and yeasts. At source the number of aerobic mesophilic bacteria was $9,62 \times 10^2$ CFU/mL, coliforms $7,8 \times 10^1$ CFU/ml, *Escherichia coli* 1 CFU/mL, *Staphylococcus* $2,74 \times 10^2$ CFU/mL, yeast 7,5 CFU/mL and there was no presence of molds. Bacterial population are gram negative bacilli in 68%, gram positive coccus 20% and gram positive bacilli by 8%, the identified species were *Shewanella putrefaciens*, *Pseudomonas stutzeri*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Brevundimonas diminuta*, *Bacillus spp*, *Enterococcus flavescens*, *Aeromonas schubertii*. Concerning to antimicrobial susceptibility was found that *Pseudomonas aeruginosa* was resistant to trimethoprim/ sulfamethoxazole and amoxicillin/clavulanic acid. The only species susceptible to all antibiotics were *Brevundimona diminuta*, *Bacillus spp* were resistant to oxacillin, *Enterococcus flavescens* showed resistance to three antibiotics (clindamycin, oxacillin, cefatolin). None of the species has metallo β lactamases. It is recommended who are in charge of the spa to perform periodic microbiological controls in order to prevent health risks to tourists.

KEY WORDS: <HOT SPRING> < YANAYACU SPA> <MICROBIOLOGY >
<MICROBIOTA > <LA TRONCAL [CANTÓN]> <CAÑAR [PROVINCIA]>

INTRODUCCIÓN

Nuestro país al estar ubicado en el cinturón de Fuego los elevados flujos térmicos y la fuerte actividad magmática, generada en la corteza terrestre permiten que la temperatura de las aguas que circulan en las profundidades aumenten y se manifiesten en la superficie como aguas calientes. (INAMHI, 2013, p.5)

En el Ecuador existe una gran diversidad de aguas termales y minerales que son utilizadas por gran parte de la población para la curación o prevención de dolencias, las mismas que no han sido objeto de estudio microbiológico y que por las condiciones físico-químicas únicas pueden albergar una microbiota autóctona, única propia de las aguas termales.

El balneario Yanayacu se encuentra ubicado en el cantón la Troncal provincia de Cañar al que diariamente acude gran cantidad de bañistas por lo que es importante el análisis microbiológico.

El presente trabajo tiene como finalidad cuantificar y caracterizar los microorganismos presentes en ella debido a que el agua al ser un vehículo importante en la transmisión de enfermedades de origen microbiano es inevitable garantizar que su utilización no conlleve riesgo para la salud de los usuarios. Por lo que es necesario efectuar un plan de muestreo del agua termal. Establecer *in situ* los principales parámetros físicos del Agua: pH, conductividad, sólidos totales, temperatura. Realizar el recuento de bacterias aerobias mesófilas, mohos, levaduras, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* /coliformes utilizando placas Petrifilm3M™ Caracterizar los microorganismos macroscópicamente y microscópicamente (tinción Gram) e identificar los clones puros aislados mediante siembra en medios selectivos, pruebas bioquímicas y Microgen ID.

Adicionalmente se efectuaran antibiogramas con las distintas especies identificadas con el fin de determinar si los microorganismos presentan resistencia o sensibilidad antibióticos.

CAPITULO I

1.-MARCO TEÓRICO REFERENCIAL.

1.1 Aguas Termales.

En función de parámetros como los minerales disueltos y temperatura se puede encontrar diversas definiciones de aguas termales.

1.1.1 Definiciones

Agua Mineral Termal: agua cuya temperatura debe ser superior al menos de 4°C, a la media anual ambiental del lugar de donde emergen. (Melgosa, 2000, pp.11)

En 1969 la OMS consideró al agua mineral natural como “aguas bacteriológicamente no contaminadas, procedentes de una fuente subterránea natural, con determinada mineralización (mínimo de mineralización de 1g por Kg de agua o CO₂ libre) favorables para la salud de la población.

Según Cadish 1964 define al agua mineral como aquella con un residuo seco superior a 1g/L, o sin tener la cantidad de residuo tenga más de 1 mg/L de litio, 5 mg/L de hierro, 5 mg/L de estroncio, 1 mg/l de iodo, 2 mg/l de flúor, 1,2 mg/l de sílice, etc. Si no se dispone de la información sobre el residuo seco se puede utilizar el total de sólidos disueltos (igual a la suma de aniones y cationes), en exceso a 1g/L. (Fagundo et al., 2004: pp.4)

Según San Martín (2000) considera al agua mineral como un agente medicamentoso que utilizado de forma oral, inhalatoria o tópica constituye un factor de bienestar y salud.

Las aguas mineromedicinales son un recurso natural que yace en estratos acuíferos subterráneos. La diferencia fundamental con las aguas de consumo ordinario es su grado de mineralización; la presencia de determinados componentes, su composición química y la microflora saprofítica. (Peña,2014,p.22)

1.1.2 Origen de las Aguas Termales.

Por su origen las aguas termales se clasifican en:

1.1.2.1 Geotérmicas: aguas de origen meteórico que se infiltran en el subsuelo, descienden por gravedad a las capas más profundas, elevando su temperatura durante su circulación subterránea, posteriormente pueden ascender hacia la superficie a través de fisuras existentes en las rocas, la temperatura de estas aguas en su punto de emergencia raramente supera los 35- 40 °C. (Pinuaga,2000,p.3)

1.1.2.2 Magmáticas: surgen de una relación directa con los filones metálicos o eruptivos poseen temperatura y composición constante. Las temperaturas de estas aguas son superiores a 50°C, en estas aguas son comunes los elementos característicos de emanaciones metálicas, tales como: boro, arsénico, fosforo, bromo, cobre, nitrógeno entre otros. (Pinuaga,2000,p.4)

1.1.3 Clasificación de las aguas minerales.

El criterio de clasificación puede ser asumido de diversos puntos de vista: temperatura, mineralización global, composición química-física, acciones fisiológicas, actividad terapéutica.

1.1.3.1 Con relación a la temperatura.

La clasificación de las aguas termales en relación a la temperatura se indica en la tabla 1-1.

Tabla 1-1: Clasificación de las aguas de acuerdo a su temperatura según Gramova (1994)

Aguas extremadamente frías.	temperaturas menores a 0°C.
Aguas frías	temperaturas entre 4°C-20°C son la mayoría de las aguas de la circulación no profunda.
Aguas termales débiles	temperaturas de 20°C-35C.
Aguas termales calientes	temperaturas entre (35-42°C), convenientes para uso externo.
Aguas termales altas	temperatura que oscila entre 42°C-100°C.
Aguas extremadamente calientes	Por encima de 100°C; aguas que se encuentra en regiones de vulcanismo.

Fuente: Fagundo et .al., 2004

La clasificación de las aguas termales según Armijo & San Martín (1994) se indica en la tabla 2-1.

Tabla 2-1 Clasificación de las aguas de acuerdo a su temperatura según Armijo & San Martín, 1994.

Frías:	aguas cuyas temperaturas son menores a 20°C.
Hipotermiales	temperaturas entre 20 y 35°C.
Mesotermiales	temperaturas que oscilan entre 35°C y 45°C.
Hipertermiales	temperaturas mayores a 45°C y hasta 50°C..

Fuente: Fagundo et al., 2004

1.1.3.2 Según su tonicidad.

Se define como tonicidad a la capacidad de una solución de producir expansión o contracción del volumen celular. Si la tonicidad del medio extracelular es mayor que del citoplasma se producirá el ingreso del agua al interior de la célula si ocurre lo contrario se producirá la salida del agua del interior de la célula.

La tonicidad se basa en la presión osmótica que en el agua mineral se relaciona con la cantidad de iones disueltos expresados en milimoles.

Las aguas que poseen una concentración de 303mmol/L ostentan una presión osmótica similar a la del suero sanguíneo. Karakolev 1987 clasifica a las aguas en relación a su tonicidad tabla 3-1 (Fagundo et al., 2004: pp7)

Tabla 3-1 Clasificación de las aguas según Karakolev (1987) atendiendo a su tonicidad.

Hipotónicas	concentraciones menores a 300mmol/L
Isotónica	concentraciones iguales a 300mmol/L
Hipertónicas	concentraciones mayores a 300mmol/L.

Fuente: Fagundo et al., 2004

1.1.3.3 De acuerdo a su composición mineral.

Respecto a su composición mineral las aguas se clasifican en: tabla 4-1

Tabla 4-1 Clasificación de las aguas de acuerdo a su composición mineral según Armijo (1994)

Aguas ferruginosas	presentan primordialmente hierro en su composición
Aguas cloruradas	con más de 1g/L de sustancias mineralizantes predominando el ión cloruro con una concentración superior a 20 % meq/L
Aguas sulfuradas y sulfurosas	Presenta azufre en su composición. Utilizadas en el campo de la hidrología médica, las primeras son ácidas y lodosas
Aguas sulfatadas	con más de 1g/L de sustancias mineralizantes predominando el ion sulfato con una concentración superior a 20 % meq/L pueden incluir sodio, calcio, magnesio o cloro en su composición.
Aguas bicarbonatadas:	con más de 1g/L de sustancias mineralizantes donde el ión carbonato predomina, con una concentración superior a 20% meq

Fuente: Fagundo et .al., 2004

1.1.3.4 De acuerdo a su actividad terapéutica.

Cuando una persona se expone a un baño termal recibe la acción directa de la temperatura produciendo un aumento de la circulación sanguínea, los minerales que estas poseen son absorbidos en pequeñas cantidades y depositados en el tejido celular subcutáneo desde donde activan el metabolismo orgánico a través del eje hipotálamo-suprarrenal. En el cuadro 1-1 se indican los beneficios de las aguas termales en relación a su composición química. (Maraver, 2006, p. 17)

Cuadro1-1 Beneficios de Aguas Termales para el organismo en relación a su composición química.

Cloruradas	favorecen la circulación sanguínea y linfática, mejoradoras de los procesos de cicatrización.
Sulfatadas	estimulantes del peristaltismo intestinal, purgantes.
Bicarbonatadas	aumentan la actividad pancreática, son hepatoprotectoras favorecen la movilización y eliminación de ácido úrico en la orina.
Carbogaseosas	por vía oral favorecen la digestión, estimulan. Por vía tópica presentan acciones vasodilatadoras.
Sulfuradas	activan los procesos oxido-reductores, mejoradores del trofismo
Ferruginosas	activan la eritropoyesis por vía oral aportan hierro.
Radiactivas	analgésicas, sedativas, antiespasmódicas y reguladoras del sistema nervioso vegetativo.

Fuente: Maraver, 2000

1.2 Balneario Termal. Definición.

Se define como un conjunto de instalaciones sanitarias próximas al manantial que son utilizadas por las personas para la mejoría de su salud en dependencia de su composición química. (López et al., 2011:pp.466)

1.2.1 Balneario Termal Yanayacu.

1.2.1.1. Localización

El Balneario Turístico Yanayacu se encuentra ubicado en la provincia de Cañar cantón La Troncal Recinto Cochancay Vía Tambo- Durán km. 83 Sector Yanayacu a una altura de 273 m.s.n.m (figura 1-1). Con una Latitud de $02^{\circ}, 27', 21.0''$, y una Longitud de $079^{\circ}, 15', 38.3''$ (GAD Municipal *La Troncal*, 2006, p.1)

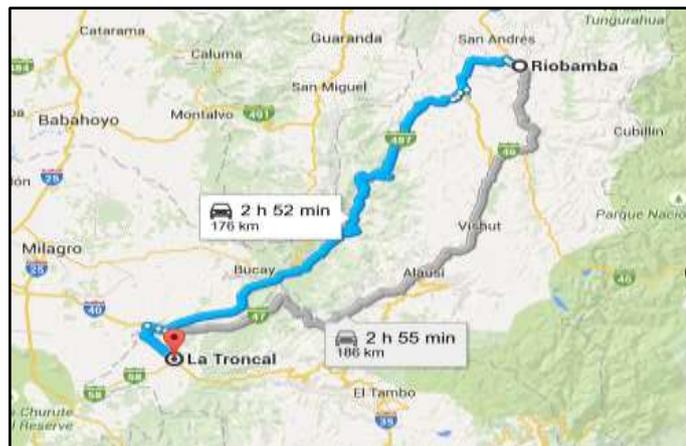


Figura 1-1 Mapa de ubicación del Balneario Termal “Yanayacu”
Fuente: Datos de mapas de Google 2015.

1.2.1.2 Descripción.

En el año 1960, Don Rafael Olmedo Peralta, inicia la construcción del complejo Yanayacu, dando paso a la perforación de suelo para la recolección de las aguas termales de origen volcánico en sus primeras piscinas (figura 2-1). Yanayacu, constituye uno de los centros turísticos más atractivos de nuestro país, por décadas ha sido visitado por propios y extranjeros, puesto que cuenta con varias vertientes de cerro con aguas calientes y frías ricas en minerales, lo que hace que esta agua tenga un poder curativo altamente reconocido contra enfermedades como: artritis, enfermedades de la piel, dolores de cabeza, incontinencia, distrofia muscular, entre otras. (GAD Municipal *La Troncal*, 2006, p.1)



Figura 2-1 Balneario Termal “Yanayacu” (La Troncal-Cañar)
Fuente: Foto Santiago Armas/Presidencia de la República.2011

En el mes de marzo de 1961 el Dr. José Munzón decano de la facultad de Bioquímica de la Universidad Central de Quito, realiza el primer estudio para determinar la composición y propiedades del agua de Yanayacu, obteniendo como resultado la presencia de sustancias como: cloruro de sodio, cloruro de potasio, sulfato de magnesio, bicarbonato de sodio. El Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología del Ecuador definen a las aguas termales del Balneario Yanayacu como cloruradas sódicas con temperaturas de 44.10°C. (INAMHI, 2013, p.25)

1.3 Características microbiológicas de las aguas termales.

Cada una de las aguas mineromedicinales termales o no poseen características físico-químicas y microbiológicas únicas, que les confieren propiedades específicas que determinan sus aplicaciones. Las aguas mineromedicinales en su emergencia tienen una población microbiana autóctona adaptada a las características (pH, temperatura, nutrientes, oxigenación), que pueden verse contaminadas por microorganismos alóctonos procedentes de las capas superiores del suelo, de donde son vehiculados por las aguas de infiltración. Las bacterias que pueden contaminar el agua mineromedicinal son: *coliformes*, *Clostridium*, *Streptococcus* que se consideran indicadores de la falta de protección de la surgencia o de la captación del agua y de mayor interés la presencia de *Escherichia coli* o *Salmonella* que suponen un riesgo sanitario. (Rodes, 2000, p.80)

En las aguas termales las bacterias que predominan según los requerimientos nutricionales son las bacterias heterótrofas oligotróficas que necesitan para su supervivencia escasos

requerimientos de carbono y nitrógeno que obtienen de la materia orgánica que se encuentra disponible por lo que se les considera beneficiosas ya que intervienen en la depuración de las aguas, no suelen fermentar los azúcares son proteolíticas, amilolíticas, amonificantes y en menor número celulíticas, adicionalmente se encuentran microorganismos autótrofos tanto quimiolitrofos como fotótrofos. En aguas hipertermales se presentan un mayor porcentaje de bacterias gram positivas, en aguas hipotermas y mesotermas predominan bacilos gram negativos y en menor proporción cocos gram positivos. (Rodes, 2000, p.81)

1.4 Análisis Microbiológico de las Aguas termales.

Las aguas de uso recreativo si no tienen la calidad sanitaria adecuada, pueden ser un factor determinante para la transmisión de enfermedades que pueden afectar la piel y mucosas del organismo humano, son aguas que se utilizan para la curación de determinadas enfermedades y que deben cumplir con requisitos sanitarios estrictos para no afectar a las personas enfermas que se someten a tratamientos con ellas. (Subprograma de control sanitario de Cuba, 2012, p.2-3)

El análisis microbiológico permite determinar los microorganismos presentes en el agua termal.

- **Bacterias Aerobias Mesófilas:** bacterias heterótrofas, aerobias y anaerobias facultativas, mesófilas y psicotróficas capaces de crecer en un medio de agar nutritivo entre un rango de 30°C a 37°C. (García et al., 2003:pp528)
- ***Staphylococcus aureus*:** son bacterias gram positivas de forma cocáceas en racimos de 0,8 a 1 µm productoras de toxinas. Para su identificación se utiliza el medio manitol en el cual las colonias producen una coloración amarilla ocasionada por el cambio de pH y por la producción de ácido debido a la fermentación del manitol. (Pahissa, 2009, p.20)
- **Coliformes Totales:** bacterias de morfología bacilar, gramnegativas, aerobias o anaerobias facultativas, oxidasa negativas y fermentadoras de lactosa en 24- 48 horas a 36°C con producción de ácido y gas. (Pascual et al., 2000:pp 17)
- **Coliformes Fecales:** están relacionadas con contaminación de origen fecal presentan las mismas características para coliformes totales además de :
 - Crecen con lactosa y la fermentan a 44,5°C±0,2°C produciendo en las primeras 48 horas ácido y gas.
 - Son coliformes termotolerantes pertenecientes a los géneros *Klebsiella* y *Escherichia*.

Escherichia coli es el más útil indicador de contaminación fecal de todo el grupo de coliformes fecales. (Pascual et al., 2000:pp17)

- **Mohos:** microorganismos aerobios mesófilos que en cinco días a 25°C, se desarrollan en la superficie del medio sólido formando colonias brillantes.
- **Levaduras:** microorganismos aerobios mesófilos filamentosos que a 25°C en la superficie de un medio sólido desarrollan colonias. (Pascual et al., 2000:pp142-143)

1.5 Crecimiento Microbiano.

1.5.1 Temperatura.

Para el crecimiento y supervivencia de los microorganismos es indispensable el factor temperatura, donde es posible distinguir.

-Temperatura Mínima de crecimiento: es la temperatura más baja a la que un microorganismo puede crecer.

-Temperatura Óptima de crecimiento: es aquella en donde el crecimiento microbiano es óptimo dado a que las reacciones enzimáticas alcanzan su máxima velocidad.

-Temperatura Máxima de crecimiento: es la temperatura más alta capaz de tolerar un microorganismo. (Negroni, 2009, p.48)

En relación a la temperatura los microorganismos se clasifican en: psicrófilos, mesófilos, termófilos y extremófilos (tabla 5-1)

Tabla 5-1 Microorganismos en relación a la temperatura óptima de crecimiento.

Psicrófilos	Microorganismos que requieren bajas temperaturas para su crecimiento, la temperatura óptima oscila entre 15°C-20°C.
Mesófilos	Microorganismos capaces de crecer entre 25°C y 40°C, siendo su temperatura óptima de 37°C.
Termófilos	Microorganismos capaces de tolerar altas temperaturas, la temperatura óptima de crecimiento oscila en los 55°C, no obstante la máxima puede ubicarse en 80°C.
Extremófilos	Microorganismos capaces de tolerar muy bajas o muy altas temperaturas.

Fuente: Negroni, 2009

1.5.2 Requerimientos de oxígeno.

En relación a los requerimientos de oxígeno las bacterias pueden ser clasificadas de la siguiente manera:

-Anaerobios: son aquellos microorganismos capaces de vivir en ausencia de oxígeno atmosférico, el aceptor final de hidrógeno es un compuesto inorgánico que puede producirse como los nitratos y sulfatos.

-Aerobios: son aquellos microorganismos que requieren oxígeno dado que este es el aceptor final de hidrógeno, con el que forman agua y CO₂.

Estos microorganismos se diferencian por producir una enzima catalasa que desdobla el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno nascente.

Microaerófilos: microorganismos que requieren bajas concentraciones de oxígeno para su crecimiento; al igual que los microorganismos aerobios estos utilizan el oxígeno como fuente de energía, no toleran la concentración del oxígeno atmosférico sino que requieren concentraciones que no superen el 15% de este gas; esto se debe a la susceptibilidad a los radicales superóxido (molécula de oxígeno con un electrón) (Negroni, 2009, p.49)

1.5.3 Metabolismo.

Es el conjunto de reacciones químicas que se da en un microorganismo para mantener su viabilidad, son reacciones: catabólicas y anabólicas.

-Catabólicas: degradan nutrientes y liberan energía.

-Anabólicas: reacciones de biosíntesis que requieren de energía. (Negroni, 2009, p.49)

1.5.4 Presión Osmótica.

Los microorganismos para su desarrollo necesitan concentraciones de sales y azúcares estas deben ser adecuadas para evitar que se produzca plasmólisis. Las altas concentraciones de estos componentes ocasionarán que la célula pierda el agua que la compone. Las bacterias capaces de tolerar altas concentraciones salinas se denominan halófilas. (Negroni, 2009, p.48)

1.5.5 Medios de Cultivo.

Para que un microorganismo pueda multiplicarse es necesario que se cultive en condiciones físicas, químicas y nutritivas adecuadas para lo cual se utilizan medios de cultivos líquidos, sólidos, continuos y discontinuos en función de la disponibilidad de nutrientes en el medio. (Totoro et al.,2007:pp.168)

Entre los medios utilizados tenemos

1.5.1.1 Medios usuales.

Aquellos que contienen sustancias nutritivas mínimas para el crecimiento de microorganismos no exigentes, además del aporte nutritivo deben poseer un pH y osmolaridad adecuados para el crecimiento bacteriano; utilizados además como bases para la preparación de otros medios. (Totoro et al.,2007:pp.168)

1.5.1.2 Medios enriquecidos.

Son medios a los cuales se les ha adicionado sangre o factores esenciales específicos como vitaminas o cofactores para el crecimiento de bacterias exigentes en cuanto a requerimientos nutritivos. En el medio de cultivo agar sangre alrededor de la colonia se puede observar un halo de hemolisis producido por las hemolinas liberadas de las bacterias. Si el halo observado alrededor de la colonia es verdoso es una hemolisis α en cambio si el agar se vuelve transparente alrededor de la colonia es una hemolisis β , estas características nos permite identificar a los microorganismos. (Totoro et al.,2007:pp.169)

1.5.1.3 Medios de Aislamiento.

Son medios sólidos, en los cuales la técnica de siembra que se utiliza es por agotamiento deben ser adecuados en cuanto a requerimientos nutricionales, es decir usuales para bacterias no exigentes y enriquecidos para bacterias exigentes. (Negroni, 2009, p.51)

1.5.1.4 Medios Selectivos.

Son medios de cultivo que permiten aislar un microorganismo determinado; contienen en su composición cloruro de sodio a concentraciones elevadas, citrato de sodio, sales biliares, así

como antibióticos que inhiben el crecimiento de la mayoría microorganismos sin afectar al microorganismo de interés. (Negroni, 2009, p.51)

1.5.1.5 Medios de Enriquecimiento.

Son medios líquidos, que cumplen el mismo objetivo de los selectivos permiten el crecimiento de los microorganismos objeto de análisis e inhiben el crecimiento de otros, es necesario que luego de su incubación el microorganismo sea resembrado por agotamiento en medios selectivos sólidos para obtener las colonias de interés. (Totorá et al.,2007:pp.172)

1.5.1.6 Medios Selectivos- Diferenciales.

En ocasiones en los medios selectivos crecen microorganismos diferentes al de interés, para lo cual es necesario añadir sustancias que otorguen a la colonia un color característico que depende de la actividad metabólica de los microorganismos que la forman. Se incorporan azúcares como la lactosa, manitol sorbitol entre otros además de un indicador de pH (azul de bromo timol, rojo neutro etc.) convirtiendo a estos medios en selectivos diferenciales. Además puede prepararse medios selectivos en base a reacciones metabólicas diferentes de la fermentación de azúcares, como la decarboxilación de la lisina, producción de ácido sulfhídrico en donde también se producen cambios de color de las colonias. (Totorá et al.,2007:pp.172)

1.6 Morfología y agrupaciones de los microorganismos.

1.6.1 Morfología.

Entre las principales características morfológicas de los microorganismos se encuentra: su tamaño y forma.

- **Tamaño:** son extremadamente pequeños oscilan entre 0,5 a 1,0 μm
- **Forma:** presentan tres tipos de morfología: las formas esféricas denominadas cocos, las cilíndricas o bastoncitos denominadas bacilos y finalmente las que presentan forma de espiral o resorte denominados espirilos.(García, 2003, p.41)

1.6.2 Agrupaciones.

Característicos de cada especie los cocos dependiendo del plano de división y la tendencia a aparecer aislados o agrupados pueden visualizarse: separados completamente (micrococos), en cadenas (estreptococos), en pares (diplococos), racimos (estafilococos) agrupación de 4

elementos (tétradas). Los bacilos por lo general no presentan agrupaciones tan complejas pueden aparecer en pares (diplobacilos) o en cadenas (estreptobacilos) figura 3-1. (Romero,2007,p.625)

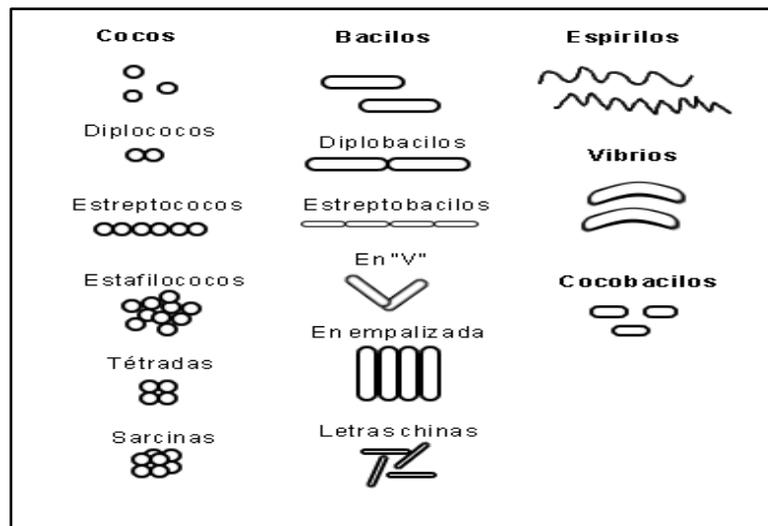


Figura 3-1 Morfología y agrupaciones de los microorganismos.
Fuente: Jiménez, 2015

1.7 Características morfológicas de las colonias bacterianas.

Son características macroscópicas de las colonias bacterianas cultivadas en un medio de cultivo e incubadas en un lapso de 18-24 horas (Montoya, 2008,p.22-23). Las características macroscópicas más importantes se describen en el cuadro 2-1.

Cuadro 2-1 Características morfológicas de las colonias bacterianas.

FORMA	Puntiforme, circular, irregular, filamentosa, rizoide u ovalada.
TAMAÑO	Se mide en mm.
ELEVACIÓN	Plana, elevada, convexa.
BORDE	Entero, ondulado, lobulado, dentado, filamentoso y rizado.
SUPERFICIE	Lisa, rugosa, plegada.
CONSISTENCIA	Cremosa, membranosa.
COLOR	Colores característicos y difusión de pigmentos en el medio.

Fuente: Díaz, 2010

1.8 Identificación Microbiana.

1.8.1 Tinción Gram

La coloración de gram diseñada por el bacteriólogo danés Hans Christian (1853-1938) tiene importancia fundamental para la diferenciación morfológica y taxonómica de las bacterias permitiendo clasificar de acuerdo a la estructura y grosor de la pared bacteria en gram positivas y gram negativas.

Para la tinción gram las células bacterianas se fijan a un placa portaobjetos con la ayuda de calor, se adiciona primeramente el colorante cristal violeta que las tiñe de color azul, posteriormente se añade lugol (iodo+ yoduro potásico) el cual forma con el cristal violeta un complejo insoluble en agua pero soluble en alcohol o acetona, al tratar con alcohol las bacterias que son gram positivas no se decoloran debido a que su pared celular está constituida por pocos lípidos y varias capas de peptidoglicano, dificultando la penetración del alcohol por el contrario en las bacterias gram negativas la pared celular presenta pocas capas de peptidoglicano recubierta por una envoltura de composición lipídica, el alcohol o acetona al disolver los lípidos incrementa la porosidad de la pared celular y arrastra el color del interior de la célula teñida produciéndose la decoloración, finalmente se tiñe con un colorante de contraste como safranina o fucsina básica (figura 4-1) (Macuralla et.al.,1994:pp.161-162)

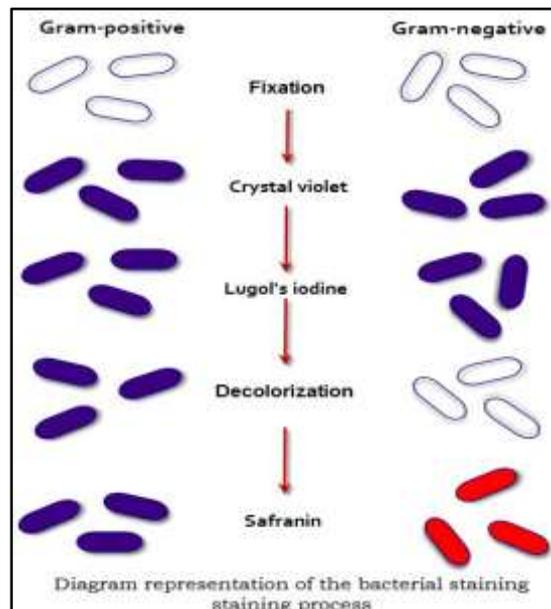


Figura 4-1Tinción Gram.

Fuente: <http://slideplayer.es/slide/1101241/>

1.8.1.1 Pared celular de las bacterias GRAM positivas.

La pared celular de las bacterias gram positivas está constituida por varias capas de peptidoglicano que le confieren una estructura rígida y gruesa poseen un espesor de 80 nm. Contienen además ácidos teicoicos que están compuestos por un grupo alcohol (glicerol o ribitol) y un grupo fosfato. Existen dos clases de ácidos teicoicos: el ácido lipoteicoico que está unida a la membrana plasmática y abarca todo la capa de peptidoglicano y el ácido mural, que está unida a la capa de peptidoglicano. Los ácidos teicoicos son los responsables de un gran parte de la especificidad antigénica de la pared celular y en consecuencia permiten la identificación de las bacterias. El grupo fosfato (carga negativa) de los ácidos teicoicos determinan su unión a cationes (iones positivos) (Totorá et.al., 2007:pp.86)

1.8.1.2 Pared celular de las bacterias GRAM negativas.

La pared celular de las bacterias gram negativas presenta:

- Una o muy pocas capas de peptidoglicano
- Una membrana externa la cual contiene lipoproteínas que unen la membrana con el peptidoglicano.
- Periplasma localizado entre la membrana externa e interna contiene una sustancia gelatinosa, una concentración elevada de enzimas degradantes y proteínas de transporte.

La membrana externa de las bacterias gram negativas contiene: lipopolisacáridos (LPS), lipoproteínas, y fosfolípidos, la intensa carga negativa dificulta considerablemente la fagocitosis constituye además una barrera que impide el paso de ciertos antibióticos, de enzimas digestivas, de metales pesados, de detergentes de sales biliares y ciertos colorantes. Sin embargo no impide el paso de nutrientes para sustentar su metabolismo; la permeabilidad de la membrana está dada por la presencia de proteínas llamadas porinas, las que forman canales de membrana y permiten el paso de sustancias como: nucleótidos, disacáridos, péptidos, aminoácidos, vitamina B₁₂ y hierro.

El componente LPS de la membrana externa es el responsable de dos características relevantes de las bacterias gram negativas:

- La fracción polisacárida está constituida por azúcares denominados polisacáridos O que actúan como antígenos y son útiles para diferenciar las distintas especies de microorganismos gram negativos.

- La fracción lipídica del polisacáridos denominado Lípido A o endotoxina ejerce un efecto tóxico sobre la circulación sanguínea o el aparato digestivo del huésped. (Titora et.al., 2007:pp.86)

1.8.2 Oxidasa

Las bacterias aerobias obtienen energía a partir de la respiración (proceso responsable de la oxidación de varios sustratos). El sistema citocromo oxidasa activa la oxidación del citocromo reducido por el oxígeno molecular el que a su vez actúa como aceptor final de electrones, produciendo peróxido de hidrogeno el último eslabón en la cadena respiratoria aerobia. Steel encontró que todos los microorganismos catalasa positivo son aerobios y anaerobios facultativos excepto el *Vibrio fetus* (tiene un requerimiento microaerófilo de oxígeno).

Para visualizar la positividad de la prueba se utilizamos tiras de papel impregnadas con el reactivo para-amino-N-dimetil-anilina, que se oxida por la citocromo-oxidasa resultando un color azul-violeta figura 5-1(Macfaddin, 2003, p.344)



Figura 5-1Prueba Oxidasa

Fuente: www.scielo.org.com

1.8.3 Catalasa.

La catalasa es una enzima presente en la mayoría de bacterias aerobias y anaerobias facultativas (exceptuando *streptococcus* y *enterococcus*) que tiene la capacidad de desdoblar el agua oxigenada en oxígeno y agua. El peróxido de hidrógeno constituye el producto final del metabolismo aerobio de los hidratos de carbono su acumulación resulta toxica para la bacteria. La reacción se da en presencia de dos moléculas de peróxido de hidrógeno, actuando una de ellas como sustrato reducido y la otra como donador de átomos de hidrógeno. La prueba se

interpreta como positiva por la presencia de burbujas alrededor del cultivo bacteriano. (Macfaddin, 2003, p.74)

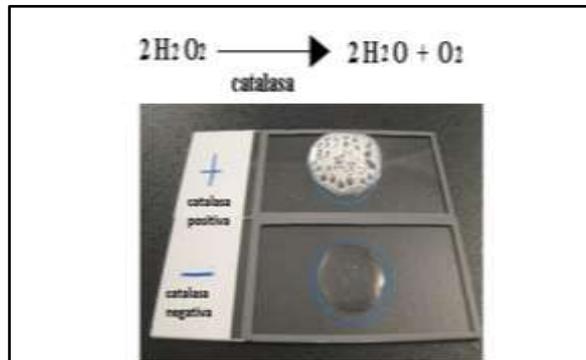


Figura 6-1 Prueba de la Catalasa

Fuente: Club de informática médica y telemedicina, 2000

1.8.4 Óxido Fermentación OF (Prueba de Hugh y Leifson)

Permite determinar si el metabolismo de los hidratos de carbono se produce por mecanismo oxidativo o fermentativo. Determinadas bacterias pueden metabolizar los hidratos de carbono solo en condiciones aerobias (vía oxidativa), mientras que otras lo realizan tanto en condiciones aerobias como anaerobias (vía fermentativa). La diferencia fundamental entre el metabolismo fermentativo y oxidativo de un hidrato de carbono radica en el requerimiento de oxígeno atmosférico y la fosforilación inicial. La fermentación es un proceso que requiere fosforilación inicial de la glucosa en condiciones anaerobias (sin requerimientos de oxígeno), en cambio la oxidación no requiere fosforilación de la glucosa ocurre de forma directa con requerimientos estrictos de oxígeno. (Macfaddin, 2003, p.355-356)

La prueba Hugh y Leifson utiliza dos medios OF (uno cubierto sin parafina y otro cubierto con parafina para generar medio aerobio y anaerobio respectivamente) (figura 7-1)



Figura 7-1 Prueba Oxido Fermentación OF

Fuente: /atlasmicrobiologia1.pdf, 2010

La interpretación de la prueba Hugh y Leifson se describe en el cuadro 3-1.

Cuadro 3-1: Interpretación de la prueba de Hugh y Leifson OF

Óxido	Fermentación	Resultados
OF (Prueba de Hugh y Leifson)		
Microorganismos Oxidativos		Producen una reacción ácida sobre el tubo abierto, presentan poco o nulo desarrollo y ausencia de producción de ácido en el tubo cerrado.
	Microorganismos Fermentadores	Producen una reacción ácida en el tubo con parafina
	Microorganismos Inertes	No se evidencian cambios en ninguno de los dos tubos
	Microorganismos Oxido-Fermentadores	Se evidencia cambios en ambos tubos.

Fuente: Macfaddin, 2003

1.8.5 Hidrólisis del Almidón

El almidón es un polímero constituido por moléculas de glucosa unidas mediante enlaces α 1, 4 y α 1, 6 que para poder ser utilizados por los microorganismos es necesario que se hidrolice a unidades más pequeñas o azúcares fermentables (como la glucosa), las enzimas amilasas excretadas por determinados microorganismos intervienen en este proceso.

Las enzimas α amilasas producen dextrinas, las amiloglucosidasa hidrolizan los dos tipos de enlaces obteniendo así unidades de glucosa. En el medio de cultivo al añadir la solución de lugol la hidrólisis del almidón se evidencia por la formación de una zona clara alrededor de la colonia si no hay hidrólisis se visualizará un color azul, figura 8-1. (Hernández et al.,2003:pp.208)



Figura 8-1: Prueba hidrólisis del almidón.

Fuente: Milian, 2012

1.8.6 Hidrolisis de la Gelatina.

Las proteínas para poder ser utilizadas por los microorganismos deben ser degradadas a polipéptidos y aminoácidos, ciertos microorganismos poseen enzimas proteolíticas denominadas gelatinasas que hidrolizan la gelatina. La presencia de un halo incoloro alrededor de la colonia después de la adición del reactivo cloruro mercúrico indica la hidrolisis de la gelatina, si existe formación de un precipitado alrededor de la colonia se considera negativo indica presencia de gelatina no hidrolizada, figura 9-1. (Bailón et al., 2003: pp.48)



Figura 9-1 Prueba hidrólisis de la gelatina
Fuente: Bailón et al., 2003

1.8.7 Pruebas Bioquímicas

1.8.7.1 Agar Hierro de Kligler (KIA)

Es un medio de cultivo diferencial de gran interés para determinar la capacidad de los microorganismos de fermentar los azúcares y producir de H_2S . Contiene dos azúcares: lactosa 1% y 0,1% de glucosa. Algunos microorganismos son capaces de fermentar los dos azúcares o fermentar solo glucosa o ninguno de los dos la fermentación puede ocurrir con presencia o no de gas tanto en anaerobiosis como en aerobiosis, figura 10-1.

En el pico de flauta la glucosa es catabolizado por la vía metabólica de Embden-Meyerhof-Parnas, producir ácido pirúvico que posteriormente es degradado a través del ciclo de Krebs para producir CO_2 , H_2O y energía. En el fondo del Agar KIA existe condiciones anaeróbicas de manera que la glucosa se metaboliza por la vía Embden-Meyerhof-Parnas, a ATP y ácido pirúvico para convertirse finalmente en: ácidos orgánicos, ácido láctico, aldehídos, alcoholes, CO_2 , H_2 y energía. (Koneman et al., 2008:pp210)

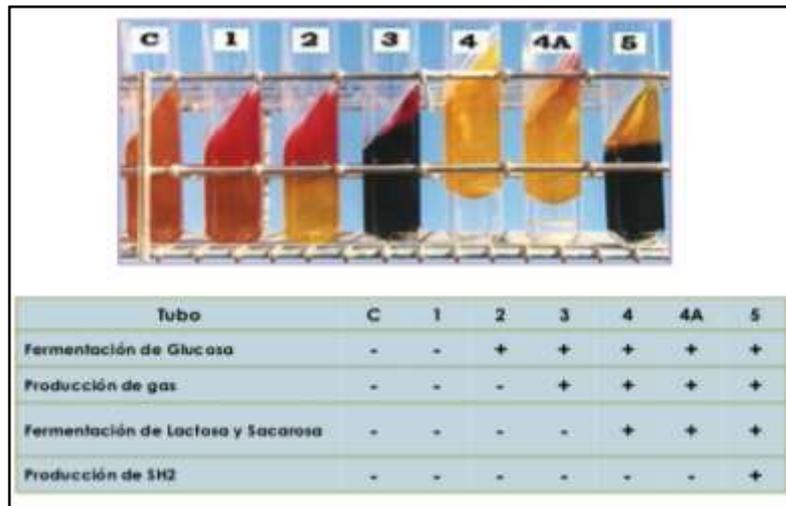


Figura 10-1 Agar hierro de Kligler (KIA)

Fuente: Izurieta, 2011

1.8.7.2 Agar Citrato (Simmons).

Es utilizado para determinar si el microorganismo es capaz de utilizar el citrato como fuente única de carbono y como fuente de nitrógeno compuestos amoniacales. Normalmente el metabolismo del citrato involucra la condensación de acetilo con coenzima A y oxalacetato para entrar al ciclo de Krebs. En la mayoría de bacterias el metabolismo del citrato es rápido por la vía del ácido tricarboxílico o la vía metabólica de la fermentación del citrato. El desdoblamiento del citrato en las bacterias transcurre sin la intervención de la coenzima A, la citratasa (citrato oxalacetato liasa) o la citrato desmolasa. (Bailón et al., 2003: pp 42)

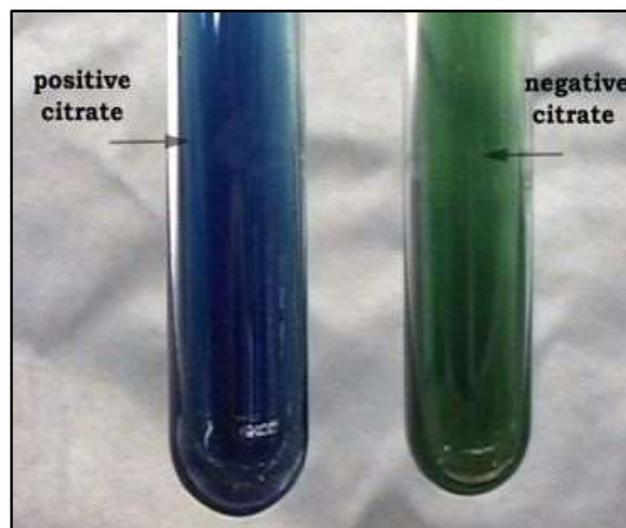


Figura11-1 Agar Citrato (Simmons).

Fuente: <https://ankiweb.net/shared/info/1083601782>

Los productos del metabolismo del citrato se indican en la figura 12-1, están en dependencia del pH del medio.

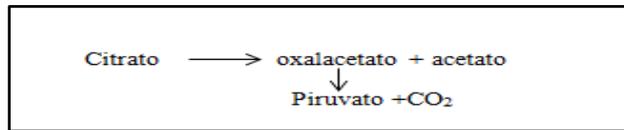


Figura 12-1 Productos del metabolismo del citrato.
Fuente: Macfaddin, 2003

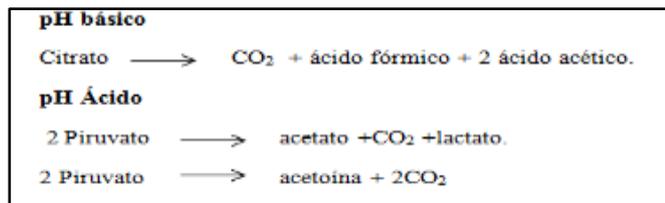


Figura 13-1 Productos de metabolismo del citrato en dependencia del pH del medio
Fuente: Macfaddin, 2003

1.8.7.3 Agar Urea.

Permite determinar si el microorganismo produce la enzima ureasa que tiene la capacidad de hidrolizar la urea en dos moléculas de amoníaco, ocasionando un cambio de color rojo en el medio, figura 14-1. En solución la urea se hidroliza a carbonato de amoníaco como producto final. (Bailón et al., 2003: pp 69)

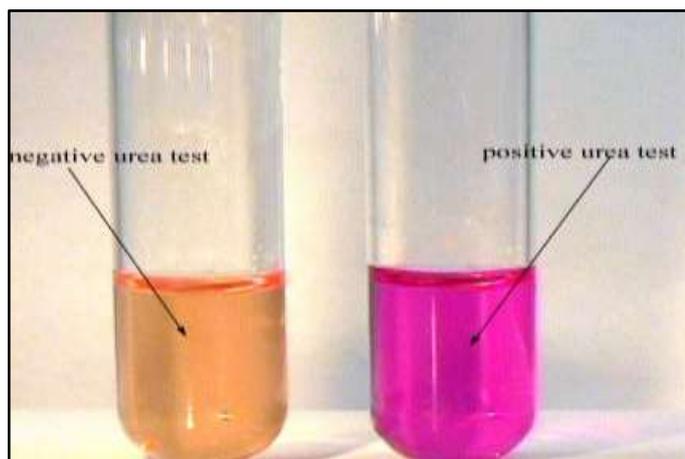


Figura 14-1: Agar Urea
Fuente: Adrienne, 2013

1.8.7.4 Agar SIM.

Prueba que permite determinar simultáneamente:

- La movilidad del microorganismo.
- La capacidad de liberar ácido sulfhídrico por acción de las enzimas sobre los aminoácidos que contienen azufre para producir una reacción que se visualiza de color negro, en presencia de un sistema indicador de H₂S.
- La capacidad para producir el indol partir de triptófano. (Bailón et al., 2003:pp.92)

1.-Producción de ácido sulfhídrico.

La proteólisis produce aminoácidos individuales. Determinados microorganismos heterotróficos pueden liberar enzimáticamente el azufre de los diferentes aminoácidos azufrados (**-SH**) obteniendo H₂S gaseoso. La enzima encargada de esta actividad es la cisteína desulfurasa.

El tiosulfato es un intermediario en la reducción de sulfato a H₂S. La bacteria reacciona con el sulfato de sodio obteniendo sulfato y sulfito (reacción de reducción); el medio de cultivo debe tener un pH ácido y una fuente de iones H⁺ para que se pueda dar la reducción del tiosulfato, éste es un proceso de respiración anaerobia donde el átomo de azufre sirve como aceptor final de electrones para la oxidación de sustratos orgánicos. El ácido sulfhídrico producido es incoloro para poder visualizarlo es necesario que reaccione con una sal de hierro presente en el medio obteniendo un precipitado negro insoluble de sulfuro ferroso metálico (figura 15-1). (Bailón et al., 2003:pp92)



Figura 15-1: Agar SIM producción de ácido sulfhídrico
Fuente: Krata, 2009

La reacción global de la producción de ácido sulfhídrico se muestra en la figura 16-1.

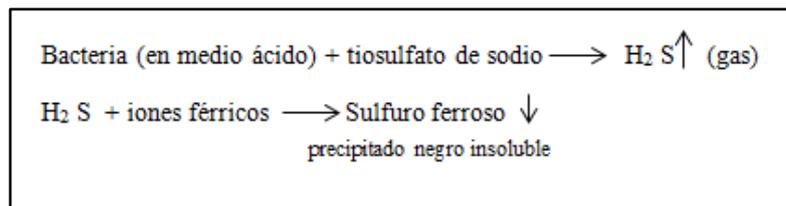


Figura 16-1 Reacción global de la producción de ácido sulfhídrico
Fuente: MACFADDIN, 2003

2.- Indol

Permite establecer la capacidad de los microorganismos de producir indol a partir del aminoácido triptófano. El triptófano pueden ser oxidado por determinadas bacterias para obtener tres metabolitos indólicos: indol, ácido indolacético y escatol, el sistema completo de enzimas que intervienen en este proceso se denominan "triptofanasa", el intermediario principal en esta degradación es el ácido indolpirúvico. La prueba resulta positiva por la formación de un anillo de color rojo en la parte superior, figura 17-1. (Bailón et al., 2003: pp 92)

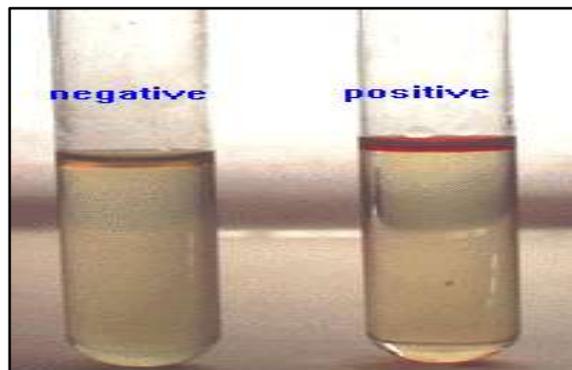


Figura 17-1 Agar SIM prueba Indol
Fuente: Jourdan, 2011

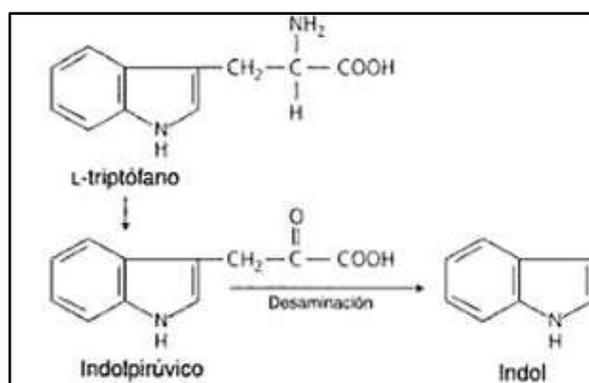


Figura 18-1 Reacción de la producción de indol.
Fuente: Macfaddin, 2003

La degradación del triptófano libera indol (figura 18-1), ácido pirúvico, amoníaco y energía. El amoníaco puede ser utilizado para sintetizar nuevos aminoácidos, el ácido pirúvico puede ser nuevamente metabolizado por medio del ciclo glucolítico o entrar al ciclo de Krebs para liberar CO₂, H₂O y energía. La prueba de indol se basa en la aparición de un complejo que se visualiza de color rojo cuando reacciona el indol con el grupo aldehído del p-dimetilaminobenzaldehído (sustancia del reactivo de Kovacs). (Bailón et al., 2003:pp92)

3.- Movilidad.

Determina si un microorganismo es móvil o inmóvil. La movilidad de una bacteria viene dada por la presencia de flagelo o flagelos. (Bailón et al., 2003:pp93)

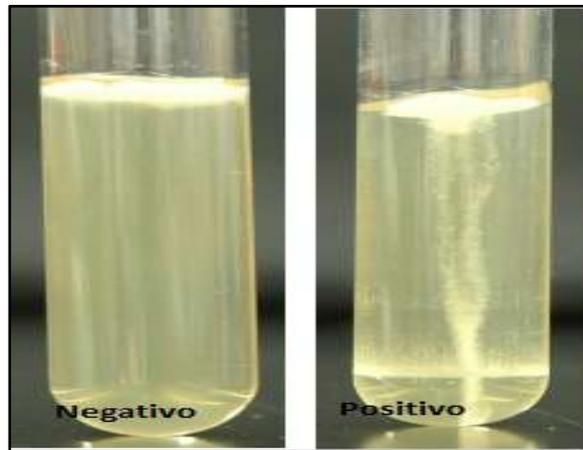


Figura 19-1 Prueba de movilidad agar SIM
Fuente: Jourdan, 2013

Un microorganismo es móvil cuando migran de la línea de siembra (figura 19-1) provocando turbidez del medio.

1.8.8 Placas Petrifilm

Son métodos de análisis microbiológicos de fácil utilización, confiables, diseñados para el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) en muestras de agua y alimentos que reemplazan a los medios de cultivos habituales. Cada placa está constituida de un agente gelificante soluble en agua, nutrientes e indicadores que colorean a las colonias para facilitar su identificación (figura 20-1). (Rodríguez et al., 2005: pp 141)

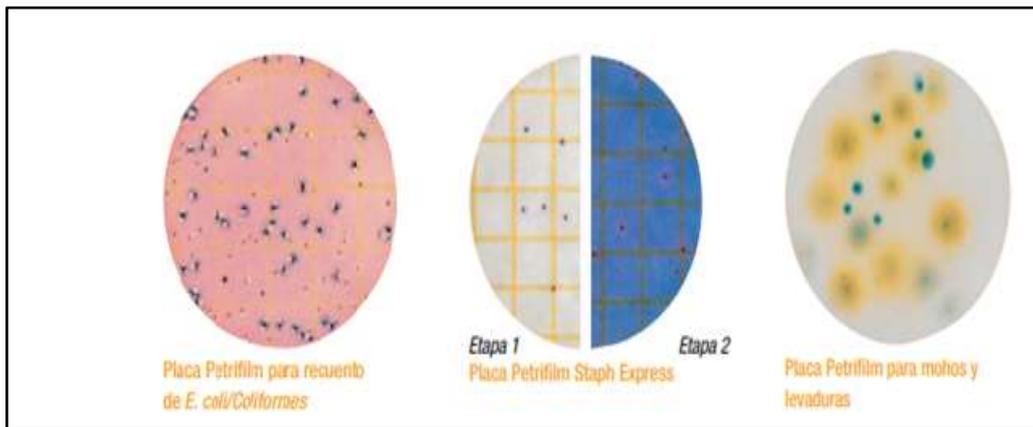


Figura 20-1 Placas Petrifilm 3M, 2009

Fuente: 3M, 2013

Las ventajas que presentan frente a las placas petri tradicionales es la utilización de menos espacio para la incubación, vida útil de 18 meses, y la fácil manipulación. Las placas Petrifilm 3M son métodos reconocidos por la AOAC INTERNATIONAL como métodos oficiales de análisis (OMA).

Las placas petrifilm disponible en el mercado son:

- Placas petrifilm para el recuento de Aerobios
- Placas petrifilm para el recuento de *E.coli*/Coliformes
- Placas petrifilm Staph Express (para recuento de *Staphylococcus aureus*)
- Placas petrifilm para el recuento de Mohos y Levaduras
- Placas petrifilm para el recuento de Enterobacteriaceae.
- Placas petrifilm para control ambiental de Listeria.(3M,2015)

1.8.9 Sistemas comerciales manuales o galerías multiprueba para identificación de microorganismos.

Estos sistemas permiten realizar de forma simultanea entre 10 y 50 pruebas consiste en celdillas aisladas que contienen sustratos liofilizados a los cuales se inoculan individualmente la muestra del microorganismo a identificar previamente disuelto en solución; los resultados se visualizan por el cambio de color que se produce luego de la incubación y adición de reactivos; se expresan de manera numérica para lo cual las pruebas se agrupan de tres en tres de manera que la suma de estos tríos es un solo resultado que permitirá la identificación ya que cada especie está definida con un código numérico. (Bou et al., 2011:pp.8)

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

El sistema Microgen GN-ID se utiliza para la identificación de la familia *Enterobacteriaceae* y de los microorganismos gram negativos oxidasa positivos y negativos no exigentes más

comunes. Contiene dos tiras de posillos GNA y GNB que contienen 12 sustratos bioquímicos estandarizados cada una. Las tiras GNA utilizadas para la identificación de microorganismos fermentadores de glucosa oxidasa negativos, nitrato positivo que incluyen los géneros más comunes de la familia *Enterobacteriaceae*. Las tiras GNA y GNB se utilizan conjuntamente para identificar bacilos gram negativos no exigentes (oxidasa negativa y positiva) y todas las especies de la familia *Enterobacteriaceae*. La tira GNB no se utiliza de manera individual. (Microgen Bioproducts LTD, 2015)

1.9 Microorganismos frecuentes en las aguas termales.

Las aguas termales no son estériles y contienen microorganismos propios de ellas o procedentes de infiltraciones desde la superficie. En España la diversidad de bacterias no patógenas ha sido estudiada por MOSSO y colaboradores especialmente las de rápido crecimiento en medios de cultivo habituales. Entre las bacterias heterótrofas de rápido crecimiento están las *Pseudomonas*, flavobacterias, *Acinetobacter* y otros géneros de gram negativos y entre los gram positivos típico del suelo se encuentran el género *Acinetobacter*, pueden además contener microorganismos que no tienen la capacidad de desarrollarse en los medios de cultivo a las que se les denomina "todavía no cultivables". (Mosso et al., 2011)

1.9.1 *Pseudomonas*.

- **Características**

El género *Pseudomonas* pertenece a la familia *Pseudomonadaceae*, son bacilos gram negativos rectos o ligeramente curvados no formadores de esporas que pueden presentar de 1,5 a 5 μm de largo y un diámetro de 0,5 a 10 μm ; oxidasa y catalasa positivo aerobios estrictos, móviles por la presencia de uno o más flagelos polares que les permiten responder a estímulos (quimiotaxis), además de localizar sustratos en bajas concentraciones. Utilizan de forma oxidativa la glucosa y otros hidratos de carbono, poseen un metabolismo aerobio estricto con el oxígeno como aceptor final de electrones, algunos géneros crecen lentamente en condiciones anaerobias utilizando el nitrato (NO_3) o la arginina como aceptor final de electrones.

La temperatura óptima de crecimiento oscila entre 30-37°C sobreviviendo y multiplicándose incluso en ambientes con elevada concentración de sales y temperaturas entre 20°-42°.

Este género coloniza rápidamente y posee habilidad para degradar sustratos incluyendo compuestos orgánicos tóxicos como hidrocarburos alifáticos y aromáticos.

Crece en agar MacConkey, como no fermentador de lactosa, nutritivamente el género *Pseudomonas* es muy versátil algunas especies pueden utilizar carbohidratos, alcoholes y aminoácidos como fuente de carbono.

En cuanto a su morfología macroscópica son capaces de producir colonias distintivas y pigmentadas, algunas cepas forman una cápsula polisacáridica que hace que las colonias sean mucosas.

En base a analogías o diferencias genéticas el género *Pseudomonas* pertenece al grupo **rRNA I**, las especies que lo constituyen se han podido distribuir en tres grupos principales.

Grupo fluorescente: las especies pertenecientes a este grupo se caracterizan por la producción de un pigmento denominado pioverdina hidrosoluble que da fluorescencia blanca a verde azulada bajo luz ultravioleta (400nm), la producción de pigmentos fluorescentes se ve favorecida por una alta concentración de fosfatos, la especie *Pseudomonas aeruginosa* es la única que produce un pigmento hidrosoluble azul definido piocianina.

Grupo Stutzeri: se caracterizan por ser desnitrificadores del suelo con la capacidad de crecer en condiciones anaeróbicas en medios que contienen nitratos con producción de gas nitrógeno pueden crecer con NH_4 como única fuente de nitrógeno y acetato como única fuente de carbono para obtener energía.

Grupo Alcaligenes: se caracterizan por ser asacarolíticos o solo débilmente sacarolíticos en el medio de OF. (Koneman, et al., 2008: pp301-304)

- **Hábitat**

Son microorganismos capaces de vivir en condiciones ambientales diversas por lo que podemos encontrar en hábitats terrestres como acuáticos hasta en tejidos diversos de animales y plantas, el hábitat primario es el ambiental. Un hábitat potencial para *Pseudomonas* es aquel con un rango de temperatura que oscila entre 4-42°C, un pH entre 4-8 y que contenga compuestos orgánicos simples o complejos. (Koneman, et al., 2008: pp304)

1.9.1.1 *Pseudomonas aeruginosa*.

Aislada por primera vez de muestras ambientales por Schroeter 1872 es un bacilo gram negativo como todos los miembros de esta familia, oxidasa positiva capaz de sobrevivir a temperaturas mayores a 42 ° C, puede utilizar más de 80 compuestos orgánicos como fuentes de carbono y energía, producen un pigmento hidrosoluble azul denominado piocianina. Se clasifican como aerobios estrictos aunque algunas cepas son capaces de vivir en condiciones anaerobias mediante la fermentación de compuestos como arginina o el piruvato o mediante desnitrificación. Debido a su capacidad de sobrevivir en ambientes acuáticos y con pocos requerimientos de nutrientes han llegado a causar problemas en ambientes hospitalarios donde se han aislado de una elevada variedad de soluciones acuosas (jabones, desinfectantes, fluidos de irrigación y de diálisis y sus equipamientos). La morfología macroscópica de la colonia es alargada, plana con un centro elevado pueden surgir variantes sobre todo cuando crecen formando biofilms, presencia de antibióticos o infecciones de carácter crónico en las vías respiratorias. (Martínez, 2007, p. 7-9)



Figura 21-1: Colonia de *Pseudomonas aeruginosa*.
Fuente: Gefor, 2011

En agar sangre la colonia produce una beta hemólisis, aparecen colonias de color gris con una periferia en expansión; a menudo las colonias tienen un brillo metálico (figura 21-1), olor a frutas, existen cepas que producen un olor picante a patatas podridas.

Cuando las cepas se aíslan en medios sólidos se puede observar la mucosidad debido a un exceso de alginato (polisacárido extracelular), la presencia de este polisacárido puede aumentar la resistencia a antibióticos y adherencia a células epiteliales. Es un patógeno oportunista de plantas y animales, los individuos más susceptibles a infecciones causadas por este microorganismo son aquellos que presentan inmunodeficiencia, pacientes con quemaduras severas, o aquellos que exhiben abrasiones mecánicas como las producidas por la implantación de catéteres. Una de las toxinas más potentes producidas por la *Pseudomonas aeruginosa* es la

exotoxina A que inhibe la síntesis proteica de las células eucarióticas una vez unida al receptor presente en ellas. La patogénesis de estos microorganismos es multifactorial, el mayor determinante de virulencia es el sistema de secreción tipo III que actúa trasportando toxinas desde la célula adherida a la célula eucariota. La resistencia natural que presenta este microorganismo se debe principalmente a la presencia de una membrana externa poco permeable, a un sistema de bombas de expulsión activa de antimicrobianos que producen lo que se denomina *impermeability-mediated-resistance*, y a una β - lactamasa Amp C. Tiene una elevada capacidad de adquirir resistencia mediante diferentes mecanismos, a los antibióticos denominados antipseudomónicos. (Martínez, 2007, p. 7-9)

1.9.1.2 *Pseudomonas stutzeri*.

Bacilo gram negativo, no esporulado, aerobio, oxidasa positivo, móvil por la presencia de un flagelo, es ubicuo del suelo y el agua; aislado como un patógeno oportunista de los seres humanos. Macroscópicamente las colonias se observan inicialmente con un aspecto seco y verrucoso de bordes elevados con un pequeño halo de diseminación pudiendo las cepas posteriormente tomar un aspecto mucoide. (Lalucat et al., 2006:pp.511)



Figura 22-1 Colonia de *Pseudomonas stutzeri*
Fuente: Gefor, 2011

Algunas cepas han recibido gran interés debido a las propiedades metabólicas específicas como la desnitrificación, la degradación de compuestos aromáticos y fijación de nitrógeno. No hay ningún factor de virulencia asociado a este microorganismo, cuando se produce infecciones generalmente afecta a un paciente inmunocomprometido expuesto a materiales médicos contaminados. (Forbes et al., 2009:pp.343)

Sensible a la mayoría de antibióticos; ha sido considerada de gran importancia por ser un posible reservorio ambiental de genes de resistencia a antibióticos. (Zhang et al., 2014: 446-447)

1.9.2 Staphylococcus.

Características

Son cocos gram positivos de 0,5 a 5 μm de diámetro, aerobios o anaerobios facultativos, inmóviles, no esporulados, no poseen cápsula, agrupados como células únicas, en pares, tétradas, cadenas cortas o con agrupación irregular que se asemeja a racimos de uvas, capaces de tolerar la desecación, el calor, las altas concentraciones salinas e inclusive algunos antisépticos fermentan azúcares con la producción de ácido láctico pero no de gas. La mayoría de microorganismos de este género producen catalasa (enzima que desdobla el peróxido de hidrogeno en agua y oxígeno libre) característica que permite diferenciar de otros géneros como *Streptococcus* y *Enterococcus*. La pared celular de los microorganismos de este género presenta ácidos teicoicos que los diferencia de los *Micrococcus*. Ampliamente distribuidos en la naturaleza algunas especies forman parte de la microbiota de la piel en los humanos, y otros se encuentran sólo entre la flora de mamíferos y aves. (Cervantes et al., 2014:pp.30)

1.9.2.1 Staphylococcus aureus.

Cocos gram positivos, no esporulados agrupados a manera de racimos o en ocasiones pueden verse aislado o en parejas. Toleran temperaturas entre 2°C-55°C. Las colonias en medios de cultivos sólidos se observan lisas, cremosas, elevadas de bordes enteros, pigmentación que varía desde amarilla a dorado por la presencia de carotenoides, cuando se cultivan en agar sangre producen β - hemólisis o hémolisis total alrededor de la colonia, pueden crecer en medios con elevada concentración de sales NaCl (7,5%). Esta especie se diferencia de las demás por producir coagulasa (enzima con la capacidad para coagular el plasma), fermentar la glucosa que permite diferenciar del género *Micrococcus*. (Cervantes et al., 2014:pp.31)

El medio de cultivo recomendable para diferenciar esta especie es el manitol ya que por su elevada concentración de sales inhibe el crecimiento de microorganismos gram negativos, esta especie fermenta el manitol produciendo un viraje en el color del medio que va de rojo pálido a amarillo por la producción de ácido (figura 23-1).



Figura 23-1 Fermentación del Manitol *Staphylococcus aureus*

Fuente: Gefor.2011

Composición antigénica y factores de virulencia.

▪ **Pared celular**

Conformada por una capa gruesa de peptidoglicano que ayuda a mantener la rigidez de la pared bacteriana y su resistencia osmótica. Es el blanco de los antibióticos como los β -lactámicos y glicopéptidos como la vancomicina, uno de los factores en la resistencia de los antibióticos son las modificaciones en la síntesis de peptidoglicano. (Chans, 2002, p. 3)

▪ **Ácidos Teicoicos.**

Constituidos por polímeros de ribitol fosfato con sustituyentes N-acetil glucosamina y D-alanina, juegan un papel muy importante en el metabolismo de la pared celular, son mediadores de la unión de los estafilococos a las superficies mucosas por medio de uniones específicas a la fibronectina, inhiben la quimiotaxis y la fagocitosis. Capaces de inducir la producción de anticuerpos. (Cervantes et al., 2014:pp33)

▪ **Proteína A**

Se encuentra unida al peptidoglicano con actividad fagocítica que viene dada por la unión a la región Fc de la IgG.

▪ **Clumping Factor**

Es una coagulasa capaz de convertir el fibrinógeno en fibrina sin intervención de factores plasmáticos, provocando la coagulación del plasma. La importancia en la patogenia de la fibrina

radica en la formación de una capa alrededor del absceso, y con ello evita la fagocitosis de la bacteria. (Chans, 2002)

▪ **Toxinas**

Hemolisinas: toxinas citolíticas que actúan en la membrana de diversas células (no solo de eritrocitos) ocasionando la lisis tisular.

Leucocidina: interfieren en el mecanismo de defensa del huésped mediante la destrucción de las células polimorfonucleares.

Enterotoxinas: su producción esta codificada en plásmidos, en fagos temperados o en el cromosoma son proteínas termo resistentes causantes de intoxicaciones alimentarias estafilocócica.

Exfoliatinas: hay dos tipos de toxinas exfoliatinas A y B responsables de producir una lesión cutánea denominada dermatitis aguda exfoliativa.

Tóxina del Shock tóxico: considerada un superantígeno, capaz de causar un shock sin bacteriemia, por difusión a partir de un foco. (Chans, 2002, p.4)

▪ **Enzimas**

Lipasas: favorecen la diseminación de la infección por los planos adiposos

Desoxirribonucleasa: es una enzima termoestable, en los procesos infecciosos actúa destruyendo el ADN de las células muertas, haciendo el pus más fluido.

Hialuronidasa: no todas las cepas la producen, es un factor de virulencia licua el ácido hialurónico (sustancia fundamental de los tejidos conjuntivos), favoreciendo la difusión.

Estafilokinasa: antagoniza la coagulas, acción fibrinolítica. (Chans, 2002, p.4)

1.9.3 Enterococcus.

Son cocos gram positivos no formadores de endosporas que se visualizan en pares o cadenas cortas, inmóviles a excepción de las especies *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus casseliflavus* anteriormente eran clasificados como *Streptococcus* grupo D de Lancefield en la actualidad son clasificados en su propio género. Son catalasa negativa o débilmente positivos, anaerobios facultativos, quimiorganotrofos con metabolismo fermentativo. Fermentan carbohidratos con producción de ácido láctico, pero no de gas, crecen en temperaturas que oscilan entre 10°C y 45°C aunque el crecimiento óptimo es a 37°C, crecen inclusive en altas concentraciones de NaCl 6,5% y un pH hasta 9,6. Todas las especies de este género son capaces de crecer en presencia de bilis al 40%, hidrolizan la esculina; se diferencian de los

Streptococcus del grupo D por la respuesta positiva a la prueba de PYR (L-pirrolindonil β -naltil-amida). Sobreviven durante 30 minutos después del calentamiento a 60°C. Pueden presentar o no hemólisis, diseminarse al contacto con las superficies contaminadas, por transmisión fecal-oral, por contacto con fluidos de personas contaminadas.

Las especies de este género que se aíslan con mayor frecuencia son: *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* forman parte de la flora normal gastrointestinal tanto de humanos como de animales y del aparato genital femenino otras especies como *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus raffinosus*, *Enterococcus casseliflavus* y *Enterococcus avium* se aíslan en menor proporción; a pesar de su bajo índice de virulencia en la última década han adquirido importancia como patógeno nosocomial.

La diseminación en el ambiente hospitalario se da por múltiples factores como:

- Resistencia a varios antibacterianos.
- Pueden contaminar el medio ambiente hospitalario y colonizar por largos periodos además si los empleados no cumplen con normas de lavado adecuadas puede ser un foco de contaminación.

Los factores mencionados ocasionaron que este género emergiera como uno de los patógenos nosocomiales más importantes. (Díaz et al., 2010:pp149-150)

✓ **Patogenicidad y virulencia.**

Tiene relevancia en los pacientes inmunocomprometidos y ancianos, las infecciones suceden cuando los mecanismos de defensa del huésped descienden ocasionados por una enfermedad o por el uso de dispositivos invasivos. Los factores de virulencia son muy poco conocidos la presencia de hemolisinas, sustancias de agregación, proteasas, aglutininas, fueron postuladas como factores de virulencia; además los carbohidratos de la pared celular o los sitios de unión de la fibronectina, favorecen la adherencia a los tejidos del huésped, incrementando así la patogenicidad. (Díaz et al., 2010:pp151)

✓ **Impacto de la Resistencia a los Agentes antimicrobianos.**

Resistencia intrínseca

La mayoría de especies de este género presenta resistencia intrínseca la cual reside en los cromosomas. Son resistentes a una gran variedad de agentes antibacterianos incluyendo cefalosporinas, ertapenem meropenem, penicilina resistentes a la penicilinasas, clotrimoxazol,

clindamicina y, aminoglucósidos. *Enterococcus faecium* adicionalmente presenta resistencia a imipenem, piperacilina, ampicilina. (Díaz et al., 2010:pp143)

Resistencia Adquirida

Todos los microorganismos de este género son resistentes a los aminoglucósidos de baja carga (CMI= 8-64ug/mL) y posteriormente también presentaron resistencia a los de alta carga CIM >2000 ug/mL; resistentes al efecto sinérgico con la penicilina o vancomicina. La resistencia a los vancomicina puede deberse al uso indiscriminado para el tratamiento de infecciones ocasionadas por SAMR (*Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina.). Está relacionada la resistencia a este antibiótico por tres genotipos van A, van B, van C, el genotipo A confiere resistencia a altas concentraciones de vancomicina y teicoplanina, van B confiere resistencia variable solo a vancomicina. La resistencia a la vancomicina debida a van C es intrínseca y fue encontrada en *Enterococcus casseliflavus* y *Enterococcus gallinarum*. Estos géneros no son epidemiológicamente importantes.

Los antibióticos β -lactámicos son el tratamiento de elección para infecciones enterocócicas la resistencia surgida a la ampicilina por la especie *Enterococcus faecium* se correlaciona con la disminución de la afinidad de las proteínas ligadoras de penicilinas para la ampicilina y la producción de β -lactamasas, los genes de β -lactamasas han sido hallados en plásmidos transferibles o en cromosomas en determinados aislamientos. (Acosta et al., 2005: pp 9-11)

1.9.4 Shewanella

Son bacilos gram negativos pertenecientes a la familia *Shewanellaceae*, saprófitos ampliamente distribuidos en las naturalezas raramente patógenas. Se encuentran, principalmente en reservorios acuáticos (marinos, de agua dulce y aguas residuales), reservas energéticas naturales (petróleo y gas) y en productos de origen animal: peces, aves, lácteos, cárnicos Las especies identificadas causantes de infecciones en humanos *Shewanella algae* y *Shewanella putrefaciens* de estas la más patógeno es *Shewanella algae* debido a la capacidad de llevar reacciones de tipo beta-hemolítico y producción de exotoxina. (Vignier et al.2013:pp151)

Las características relevantes que permiten diferenciar estas dos especies se describen en la figura 24-1.

	<i>S. algae</i> (IAM 14159)	<i>S. algae</i>	<i>S. putrefaciens</i> (ATCC 8071)	<i>S. putrefaciens</i>
Oxidase	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+
Indole Production	-	-	-	-
Arginine dihydrolase	-	-	-	-
Lysine decarboxylase	-	-	-	-
Ornithine decarboxylase	+	+	+	+
H ₂ S production	+	+	+	+
Urea hydrolysis	-	-	-	-
Gelatine hydrolysis	+	+	+	+
DNA hydrolysis	+	+	+	+
Nitrate reduction	+	+	+	+
Nitrite reduction	+	+	-	-
Acid from				
Arabinose	-	-	-	-
Ribose	(+)	(+)	+	D
Glucose	(+)	(+)	+	D
Fructose	(-)	(+)	-	D
Mannitol	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-
Maltose	-	-	-	D
Sucrose	-	-	-	D
Growth				
4°C	-	-	+	+
42°C	+	+	-	-
NaCl 6-6.5%	+	+	-	-
Haemolysis (sheep blood, 48h)	+	+	-	-
Mucoid colony consistency	+	+	-	-
Parentheses indicate delayed/weak reactions; d, variable results				

Figura 24-1 Pruebas bioquímicas para diferenciar entre la especie *Shewanella algae* y *Shewanella putrefaciens*

Fuente: Ocaña, 2011

Adicionalmente la especie *Shewanella algae* se diferencia de la especie *Shewanella putrefaciens* por ser capaces de crecer a 42°C, en NaCl 6.5%, colonias, reducir el NO₂⁻ y presentar resistencia a la colistina.

En la industria es objeto de interés por la descomposición que produciría en el pescado (deterioro aeróbico en frío), carnes envasadas al vacío (produce trimetilamina, SH₂ y otros). En

el medio ambiente por su contribución en la reducción de compuestos orgánicos halogenados, en el ser humano pueden ser causante de infecciones. (Vignier et al.2013:pp154)

1.9.4.1 Shewanella putrefaciens.

Aislada por primera vez en 1931 a partir de la mantequilla podrida denominada anteriormente como *Achromobacter putrefaciens*, *Pseudomonas putrefaciens*, *Alteromonas putrefaciens*, y finalmente *Shewanella putrefaciens*. Es un bacilo gram negativo, no fermentador, oxidasa positiva, productor de sulfuro de hidrógeno (H₂S) en medios TSI, oportunista que produce infecciones en pacientes inmunosuprimidos o que han ingerido alimentos contaminados con esta especie; los cuadros clínicos más comunes son :infección de la piel, tejidos blandos y hueso.

Presenta resistencia natural a penicilinas y es productor de β-lactamasas tipo D que lo convierte en un patógeno difícil de controlar asociado a la alta mortalidad debido al tipo de infecciones que ocasiona(abscesos esplénicos, neumonía y fascitis necrosante). Susceptibles a antibióticos carbapenémicos, quinolonas, eritromicina, y aminoglucósidos además presentan susceptibilidad variable a ampicilina y cefalosporinas presentando mayor sensibilidad a los de tercera y cuarta generación. (Muñoz et al., 2014: pp 2-3)

1.9.5 Aeromonas.

Pertenece a la familia *Aeromonaceae* son bacilos gram negativos con extremos redondeados, no formadores de esporas de movilidad variable, no encapsulados anaerobios facultativos con temperaturas óptimas de crecimiento entre 5°C y 45°C, que varían según la especie. Habitan en ambientes acuáticos, aves, peces, reptiles, alimentos. (Bravo et al., .2012:pp.44)

Responsables de infecciones extra intestinales y gastrointestinales en pacientes inmunocomprometidos niños, ancianos, son capaces de pasar al torrente sanguíneo y producir infecciones en diferentes órganos y sistemas en individuos con factores predisponentes (diabetes mellitus, inmunodepresión). Se pueden adquirir estas infecciones en el ambiente hospitalario o en la comunidad por la ingestión de alimentos, agua contaminada o el empleo de dispositivos intravenosos. Las especies patógenas de importancia clínica en casos de diarreas son: *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas veronii biovar sobria*, *Aeromonas caviae* y, en menor proporción, *Aeromonas veronii biovar veronii*, *Aeromonas jandae* y *Aeromonas schubertii*.

Sensibles a antibióticos como trimetoprima-sulfametoxazol, cloranfenicol, amikacina, gentamicina, penicilina. (Bravo et al., 2012:pp: 46)

Las características que permite diferenciar a este género de otros se describe en el cuadro 4-1

Cuadro 4-1 Pruebas Bioquímicas para Identificación del Género *Aeromonas*.

Requerimientos de Oxígeno	Fac
Catalasa	+
Oxidasa	+
Agar Mac Conkey	V
Reducción de Nitratos	+
Movilidad 37°C	V+
Glucosa O/F	F/O
Fac : facultativo	+ : Positivo
V : variable	V+ : variable por lo general positivo
F/O : fermentativos y oxidativos	

Fuente: Macfaddin, 2004

Las pruebas utilizadas para la identificación de especies se detallan en el cuadro 5-1.

Cuadro 5-1 Pruebas Bioquímicas para Identificación de especies del Género *Aeromonas*.

	<i>A.caviae</i>	<i>A.hydropila</i>	<i>A.shubertii</i>	<i>A.sobria</i>	<i>A.veronii</i>
PRUEBRA					
Catalasa	+	+	+	+	+
Oxidasa	+	+	+	+	+
NO ₃ → NO ₂	+	+	+	+	+
Movilidad	+	+	+	+	+
Glucosa	A	A	-	-	A
Lactosa	V	V	-	-	A
Arabinosa	A	A	-	-	-
Celobiosa	V+	-	-	V	V
Glicerol	V	A	V	V	A
Manitol	A	A	-	V	A
Maltosa	-	A	A	A	A
Sorbitol	-	-	-	V	-
Indol	+	+	-	+	+
Dnasa	+	+	+	+	+
Citrato(Simmons)	V	V	V	-	+
Hidrolisis de la esculina	+	+	-	-	+

Fuente: Macfaddin, 2004

1.9.6 *Brevundimonas*.

Son bacilos rectos, delgados aerobios, gram negativos no fermentadores de lactosa, móviles por la presencia de un flagelo polar único, catalasa variable siendo por lo general positiva, con temperaturas óptimas de crecimiento que oscila entre 35-37°C.

Anteriormente clasificados como *Pseudomonas* son microorganismos ambientales aislados a partir del agua, suelo, plantas rara vez aislada de muestras clínicas. *Brevundimonas diminuta* ha sido reportada en pacientes inmunodeprimidos y rara vez inmunocompetentes es de gran importancia para purificar desechos de origen industrial y disminuir así la contaminación. Este género muestra susceptibilidad a los aminoglucósidos, susceptibilidad variable a penicilinas antipseudomonas y cefalosporinas de tercera generación. (Restrepo et al., 2010: pp 246-247)

Las pruebas bioquímicas para identificar la especie *Brevundimonas diminuta* se indican en el cuadro 6-1.

Cuadro 6-1 Pruebas bioquímicas para identificación de especies del género *Brevundimonas*.

PRUEBA	<i>Brevundimona diminuta</i>	<i>Brevundimona vesicularis</i>
Catalasa	+	V
Oxidasa	+	+
42°C	V	V
NO ₃ → NO ₂	-	-
Mac Conkey (MAC)	G	NG
Arginina deshidrolasa	-	-
Lisina descarboxilasa	-	-
Hidrólisis del almidón	-	+
Ureasa	V	-
Glucosa	V	A
Lactosa	-	-
Manitol	-	-
V: variable G: crecimiento	NG: no hay crecimiento A: ácido	

Fuente: Macfaddin, 2004

1.10 Técnicas de estudio de sensibilidad a los antimicrobianos.

El estudio de la sensibilidad de las bacterias a los antimicrobianos se efectúan mediante métodos fenotípicos (técnicas de dilución y difusión), bioquímicos y genéticos.

El antibiograma (método fenotípico) es el más utilizado mide la sensibilidad in vitro de una bacteria frente a diversos antimicrobianos que permitirán predecir su eficacia in vivo. De acuerdo a la CMI a los microorganismos se clasifican en categorías clínicas: sensibles, intermedias, resistentes. Se define como CMI a la mínima cantidad de antimicrobiano capaz de inhibir el crecimiento de un microorganismo. Se considera un microorganismo sensible a un antibiótico cuando a dosis habituales este alcanza niveles plasmáticos iguales a la concentración mínima inhibitoria (CMI), en el lugar de la infección. Por el contrario se considera resistente un microorganismo a un antimicrobiano cuando la concentración máxima de antibiótico en el lugar de la infección (líquidos, tejidos, suero) no es suficiente significando que la CMI es inferior a la necesaria para eliminar al microorganismo, y que por su efecto tóxico a dosis elevadas se hace imposible subir la concentración. Se establece también una sensibilidad intermedia se refiere que al elevar las dosis del antimicrobiano no produce efectos tóxicos. Las técnicas de dilución para determinar la CMI, para su realización se utiliza Agar Mueller Hinton y discos impregnados con una solución estandarizada de antibiótico que se colocan en la superficie del agar previamente realizada la siembra del microorganismo, el halo que se forma luego de la incubación por 24 horas está relacionado con el grado de sensibilidad de un microorganismo; por lo general halos pequeños (resistentes), halos grandes (sensibles) (Cercenado et al., 2011: pp 214-216)

1.10.1 Mecanismo de resistencia antimicrobiana.

Dentro de los mecanismos responsables de la resistencia a los antibióticos se encuentran:

- La pared celular se vuelve impermeable a la acción de los agentes antimicrobianos.
- El microorganismo produce enzimas que modifican o destruyen el agente antimicrobiano.
- El sitio de ataque es alterado por mutación lo que impide la unión con el agente antimicrobiano.
- El microorganismo posee una bomba de eflujo que expulsa al agente antimicrobiano.
- Rutas metabólicas específicas dentro del microorganismo son alteradas genéticamente para que el agente antimicrobiano no pueda provocar efecto.

En determinados microorganismos la resistencia es una característica intrínseca o innata además pueden adquirir resistencia a los agentes antimicrobianos por efectos genéticos: mutación, conjugación, transformación, transducción y transposición. (Cavaliere et al., 2005: pp.8-10)

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1 Lugar de Investigación.

El Balneario Termal Yanayacu del cantón la Troncal Provincia de Cañar fue objeto de investigación en el presente trabajo, se tomaron muestras por duplicado de dos sitios específicos de donde emergen las aguas termales, se procedió a medir en *in situ* parámetros físico-químicos. El análisis microbiológico se efectuó en el Laboratorio de Análisis Bioquímicos y Bacteriológicos de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

2.2 Unidad de Análisis

Calidad sanitaria y microbiota autóctona de las aguas termales del Balneario Yanayacu.

2.3 Factores de Estudio

- **Población:** Aguas termales.
- **Muestra:** Aguas termales del Balneario Yanayacu localizado en el cantón La Troncal Provincia de Cañar

2.4 Tamaño de Muestra

El muestreo se realizó por duplicado en dos puntos donde emergen las aguas termales del balneario Yanayacu: ojo de agua en contacto con el ambiente que posteriormente se llamará fuente y ojo de agua del interior de la piscina que posteriormente se denominará piscina.

2.5 Materiales, Equipos, Reactivos

Las muestra utiliza fue el agua Termal del Balneario Yanayacu localizado en el cantón La Troncal Provincia de Cañar.

Cuadro 7-2: Materiales de Laboratorio

-Cooler
-Reverbero
-Mascarilla
-Mechero
-Mandil
-Guantes
-Tiras indicadoras de pH
-Pipetas 100 y 1000ul
-Erlenmeyer de 100 y 250 mL
-Palillos de madera
-Envases de plástico estéril 120mL
-Caja Petri
-Probeta de 100mL
-Puntas Amarillas y Azules
-Asa de platino
-Gradillas
-Tubos de ensayo
-Placa porta y cubre objetos
-Algodón
-Vaselina
-Alcohol
-Discos de Sensibilidad
-Marcador indeleble
-Pinza punta plana

Realizado por: RAMOS, 2015

Cuadro 8-2: Equipos

-Multiparámetro
-Cámara de flujo laminar
-Estufa bacteriológica
-Autoclave
-Microscopio

Realizado por: RAMOS, 2015

Cuadro 9-2: Reactivos.

-Agua Destilada
- Cloruro mercurico
- Kovac's
-Cristal Violeta
-Lugol
-Alcohol-cetona
-Safranina

Realizado por: RAMOS, 2015

Cuadro 10-2: Medios de Cultivo.

-Petrifilm 3M Aerobios Mesófilos
-Petrifilm 3M <i>E.coli</i> /coliformes
-Petrifilm 3M <i>Staph</i> Express
-Petrifilm Mohos y Levaduras
-Agar Mueller Hinton
-Agar Movilidad
- Agar Almidón
-Agar Gelatina
-Medio Hugh-Leifson
-Agar King B
-Agar Eosina Azul de Metileno
-Agar Manitol
-Agar MacConkey
-Agar Hierro de Kligler
-Agar Urea
-Agar Citrato de Simmons
-Medio SIM

Realizado por: RAMOS, 2015

2.6 Métodos y Técnicas

2.6.1 Muestreo.

La muestra se tomó del lugar de donde emergen las aguas termales. Los recipientes utilizados fueron de plástico estériles llenados las $\frac{3}{4}$ partes. Una vez destapado el recipiente se tomó del cuello se colocó la boca del recipiente en sentido contrario de la corriente de agua se efectuó antes de coger la muestra definitiva dos lavadas del recipiente con la misma agua, se tapó rápidamente y se procedió a homogenizar. La muestra se trasladó al laboratorio a temperatura ambiente.

La muestra recogida fue identificada debidamente siguiendo la norma NTE INEN 2176:2013.

- Localización y nombre del sitio del muestreo
- Detalles del punto de muestreo
- Fecha de la recolección
- Método de recolección
- Hora de la recolección
- Nombre del recolector
- Condiciones atmosféricas
- Datos recogidos en el campo

2.6.2 Análisis Físico-Químico.

El Multiparámetro HANNA se utilizó para la determinación *in situ* de los parámetros necesarios para la investigación: pH, conductividad y sólidos totales se procedió primeramente a calibrar el instrumento con agua destilada, posteriormente se sumergió en la muestra de agua termal. Para determinar la temperatura ambiental se utilizó un termómetro de mercurio.

2.6.3 Análisis Microbiológico

2.6.3.1 Recuento de bacterias aerobias mesófilas, E.coli/coliformes, Staphylococcus aureus, mohos y levaduras por el método de placas con película secas rehidratables petrifilm.

Se trabajó por duplicado con 1mL de la muestra de agua termal. Primeramente se procedió a levantar el film superior, con ayuda de la pipeta se colocó 1mL de la muestra en el centro del film inferior se soltó el film superior con cuidado evitando la formación de burbujas de aire, se colocó el aplicador por encima del film superior bien centrado sobre el inóculo aplicando presión se procedió a levantar el aplicador; fue necesario esperar de 2-5 minutos para que

solidifique el gel. Finalmente se incubaron las placas petrifilm a una temperatura de $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante un lapso de tiempo que varió según el método.

- Aerobios mesófilos por 72 horas.
- E.coli/coliformes durante 48 horas.
- *S. aureus* por 24 horas.
- Mohos y levaduras temperatura ambiente por 48 horas.

Finalizado el tiempo de incubación los resultados obtenidos fueron expresados como Unidades Formadoras de Colonias (UFC/mL).

2.6.3.2 Descripción macroscópica del aislado bacteriano.

Los parámetros utilizados para la descripción macroscópica del aislado bacteriano se describen en el cuadro 12-2

Cuadro 11-2: Características macroscópicas del aislado bacteriano.

FORMA	Puntiforme, circular, irregular, filamentosa, rizoide u ovalada.
TAMAÑO	Se mide en mm.
ELEVACIÓN	Plana, elevada, convexa.
BORDE	Entero, ondulado, lobulado, dentado, filamentoso y rizado.
SUPERFICIE	Lisa, rugosa, plegada.
CONSISTENCIA	Cremosa, membranosa.
COLOR	Colores característicos y difusión de pigmentos en el medio.
LUZ TRANSMITIDA	Opaca, translúcida y transparente.
LUZ REFLEJADA	Opaca, brillante.

Fuente: Díaz, 2010

2.6.3.3 Estabilización del Aislado Bacteriano

De cada placa de petrifilm sembrada se escogieron las colonias bacterianas en dependencia de su, forma y capacidad de crecimiento teniendo al menos una colonia representativa de cada tipo. En el medio de cultivo Mueller Hinton, se inocularon 34 colonias seleccionadas, se realizó al menos 3 repiques hasta conseguir un crecimiento continuo. En base a criterios de morfología macroscópica se procedió a escoger las colonias para realizar la siembra por agotamiento con el fin obtener clones puros.

2.6.3.4 Siembra por agotamiento para la obtención de clones puros.

Luego del ultimo repique se procedió a realizar la siembra por agotamiento el medio utilizado fue agar Muller Hinton. Se procedió a tomar la muestra con el asa previamente esterilizada se comenzó estriando hasta las $\frac{3}{4}$ del agar, se giró la caja y a partir de la última estria realizada se cogió muestra con el asa esterilizada para volver a estriar, lo mismo se efectuó en los espacios siguientes (figura 26-2). Posteriormente se incubó las placas invertidas a una de temperatura de $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por un lapso de 24 horas, transcurrido el tiempo se observó en la placa crecimiento de colonias aisladas a las cuales se realizó el gram para confirmar la pureza de la colonia.

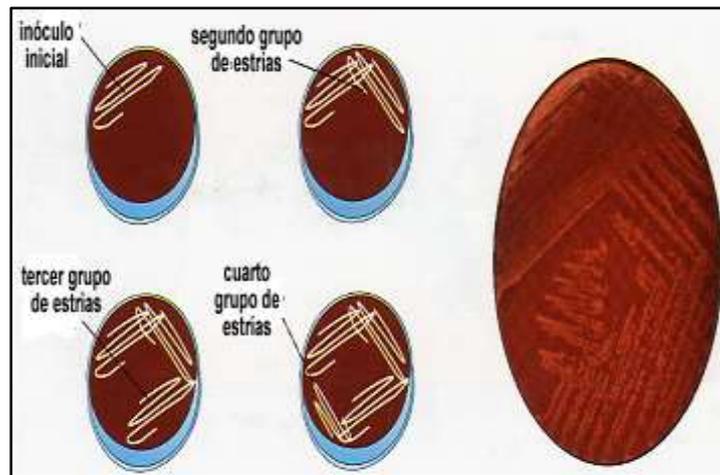


Figura 25-2 Siembra por Agotamiento.
Fuente: Piña, 2012

2.6.3.5 Tinción Gram de las Colonias Aisladas.

En una placa portaobjetos se colocó una gota de suero fisiológico, se procedió a tomar con un palillo esterilizado la colonia se removió y posteriormente se fijó la muestra a la placa con la ayuda de un mechero. Se utilizaron cuatro reactivos para la tinción de gram: lugol, iodo, alcohol- cetona y safranina durante un minuto a excepción del alcohol-cetona (30 segundos), en cada adición de reactivo se enjuagó con agua, se dejó secar. Para observar con el lente de 100x del microscopio se adicionó gotas de aceite de inmersión a la placa.

2.6.3.6 Prueba de la Oxidasa.

Para la realización de esta prueba el clon debió ser de no más de 24 horas de crecimiento con el fin de evitar falsos-positivos, se procedió con la ayuda de un palillo previamente esterilizado a coger una pequeña cantidad de la colonia se colocó en la tira reactiva de oxidasa la presencia de un color violeta a negro fue interpretada como positiva.

2.6.3.7 Prueba de la Catalasa.

Previamente se colocó en una placa portaobjetos agua oxigenada, con la ayuda de un palillo esterilizado se cogió una pequeña cantidad de la colonia la cual se adicionó en la placa preparada con peróxido de hidrógeno (agua destilada).La producción rápida de burbujas se interpretó como positiva.

2.6.3.8 Oxido fermentación.

El medio utilizado para la prueba de óxido-fermentación es Hugh-Leifson, los componentes utilizados para su preparación se describen en la tabla 6-2.

Tabla 6-2 Componentes y preparación del Medio Hugh-Leifson (OF)

Triptona 2,0 g	Se disuelve en el agua destilada todos los componentes a excepción del agar posteriormente se adiciona el agar y el azul de bromotimol al 0,2%.El medio preparado se calentó con la ayuda del reverbero hasta ebullición; se esterilizó a una temperatura de 121°C durante 20 minutos, se enfrió y se adicionó una solución de glucosa al 10% filtrada por cada 100mL, finalmente se dispensó 5mL del medio preparado en cada tubo estéril.
Cloruro sódico 5,0 g	
Fosfato dipotásico 0,3 g	
Agar 3 ,0 g	
Agua destilada 1000 mL	
Ajustar el pH a 7,1	

Fuente: Andueza, 2008

Para cada colonia se utilizó 2 tubos en los cuales se sembró en picadura con la aguja del asa hasta la mitad del medio, en uno de los tubos se colocó vaselina con el fin de crear un ambiente de anaerobiosis y el otro quedó expuestos al aire (aerobiosis).

Los resultados se interpretaron de la siguiente manera:

Microorganismos Oxidativos: Producen una reacción ácida sobre el tubo abierto ocasionado viraje de color a amarillo.

Microorganismos Fermentadores: Producen una reacción ácida en el tubo con parafina ocasionando un viraje de color a amarillo

Microorganismos Oxido- Fermentadores: Se evidencia cambios en ambos tubos (viraje de color a amarillo)

Microorganismos Inertes: No se evidencian cambios en ninguno de los dos tubos.

2.6.3.9 Movilidad

Los componentes necesarios para la preparación del agar movilidad se describen en la tabla 7-2

Tabla 7-2 Composición y preparación del Agar Movilidad

Extracto de carne 3,0 g	Se procedió a disolver todos los componentes en agua destilada con ayuda de calor hasta ebullición, el medio preparado se repartió en tubos de ensayo(5 mL) procediendo a esterilizar en el autoclave a 121°C durante 20 minutos trascurrido en tiempo se dejó solidificar en posición vertical.
Peptona 10,0 g	
Cloruro sódico 5,0g	
Agar 4,0g	
Agua destilada 1000MI	
Ajustar el pH a 7,1	

Fuente: Andueza, 2008

Para la prueba de movilidad se cogió una pequeña cantidad de la colonia con el asa esterilizada, se introdujo en el tubo de manera recta hasta la mitad de medio, se tapó el tubo y se procedió a incubar a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas.

El crecimiento fuera de la línea de siembra y la presencia de turbidez indicaron movilidad positiva

2.6.3.10 Pruebas utilizadas para la identificación de Bacilos Gram Positivos.

▪ Hidrólisis del Almidón

El medio utilizado para la hidrólisis del almidón y su forma de preparación se detalla en la tabla 8-2.

Tabla 8-2 Composición y preparación del Agar utilizado para la hidrólisis del almidón.

Extracto de carne 3,0 g	En el agua destilada se procedió a disolver con la ayuda de calor todos los componentes. Se esterilizó en autoclave a 121° C durante 20 minutos finalmente en cada caja petri se distribuyó 20mL.
Almidón soluble 10,0 g	
Agar 12,0 g	
Agua destilada 1000mL	
Ajustar el pH a 7,5	

Fuente: Andueza, 2008

La siembra realizada fue en estría se incubó en la estufa a 35 ± 2 por 8 días trascurrido el tiempo se agregó lugol cubriendo toda la placa la visualización de un halo transparente alrededor de la colonia indicó que la prueba era positiva es decir que la bacteria contiene enzimas amilasas que hidrolizan el almidón.

- **Hidrolisis de la gelatina**

Los componentes y forma de preparación de este medio se detallan en la tabla 9-2-

Tabla 9-2 Composición y preparación del Agar utilizado para la hidrólisis de la gelatina.

Extracto de carne 3,0 g	La preparación del medio se efectuó de la misma manera que para la hidrólisis del almidón exceptuando el ajuste de pH que debió ser de 7,2.
Gelatina 30,0 g	
Agar 12,0 g	
Agua destilada 1000mL	

Fuente: Andueza, 2008

Se procedió a tomar una pequeña muestra del clon se realizó la siembra en la superficie del medio, dejando incubar en la estufa de 2-8 días a una temperatura de $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ trascurrido el tiempo de incubación para poder revelar se utilizó cloruro mercúrico la formación de un precipitado blanco indicó que no hubo hidrólisis de la gelatina, la ausencia de este precipitado demostró la hidrólisis de la gelatina.

2.6.3.11 Pruebas utilizadas para la identificación de Bacilos Gram Negativos.

Los medios utilizados para la identificación de bacilos gram negativos fueron Agar Eosina Azul de Metileno y Agar MacConkey los cuales se prepararon de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

- **Agar (King B)**

Es un medio de cultivo para la detección del género *Pseudomona*, su composición y preparación se describen en la tabla 10-2

Tabla 10-2 Composición y preparación del Agar King B

Peptona 20,0 g	Se disolvió en el agua todos los componentes por calentamiento suave. El pH se ajustó a $7,0 \pm 0,2$. Se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 minutos posteriormente se distribuyó en placas petri estériles a razón de 20 ml.
Glicerol 10,0 g	
Fosfato potásico 1,50 g	
Sulfato magnésico 1,50 g	
Agar 15,00 g	
Agua destilada 80,0 mL	

Fuente: Andueza, 2008

Se tomó una pequeña parte de la colonia con el asa esterilizada se realizó una siembra en estría y se incubó durante 24 horas a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Se consideró como positivo la aparición de una coloración amarilla, amarilla verdoso fluorescente que rodeó a la colonia o que se extendió por todo el medio

▪ **Pruebas bioquímicas.**

Son pruebas utilizadas para evaluar la actividad bioquímica o metabólica de las bacterias, cultivando en un medio que contenga un sustrato que la bacteria al crecer tendrá la capacidad de transformarlo o no (figura 26-2)

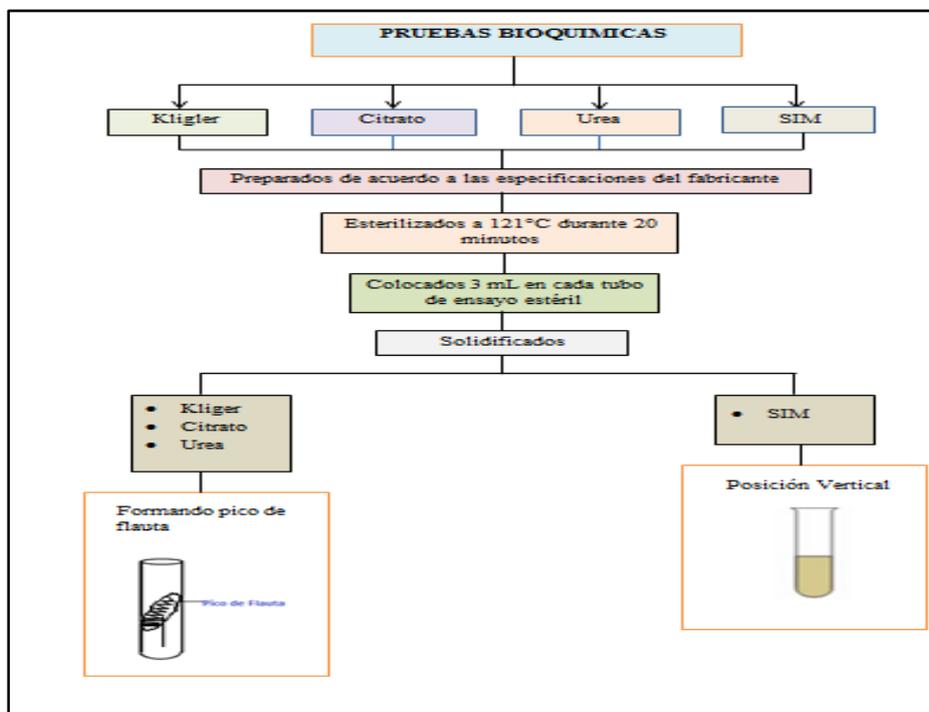


Figura 26-2 Preparación de los medios de los medios utilizados para las pruebas bioquímicas.

Fuente: Ramos, 2015.

✓ **Kliger**

Permite determinar si el microorganismo fermenta azúcares como la glucosa y lactosa, para lo cual con la aguja del asa se cogió parte de la colonia y se introdujo hasta la mitad en el agar se retiró lentamente y en el pico de flauta se realizó una estría en forma de S, la temperatura de incubación fue de $35^{\circ}\text{C}\pm 2$ por el transcurso de 24 horas, posterior a esto se procedió a la lectura.

La presencia de una coloración amarilla en el fondo del tubo indicó fermentación de la glucosa por el contrario si el cambio ocurrió en el pico de flauta fue por la fermentación de la lactosa, si se evidenció cambio en todo el tubo el microorganismo fermentó los dos azúcares. La conservación del color rosa –rojizo indicó que la prueba fue negativa, la producción de gas se visualizó por la aparición de burbujas o la elevación del agar, coloración negra en el agar fue indicativa de producción de H_2S

✓ **Citrato.**

Determina si un microorganismo es capaz de utilizar el citrato como única fuente de carbono. Se procedió a coger parte de una colonia pura con el asa estéril, la cual se introdujo en el tubo mediante una punción hasta la mitad de agar y en el pico de flauta se realizó una estría, el tiempo de incubación fue de 24 horas a una temperatura de $35^{\circ}\pm 2$. La prueba se interpretó como positiva por el viraje de color de verde a azul intenso en todo el tubo o en pico de flauta.

✓ **Reacción de Ureasa.**

Permite determinar la capacidad de un microorganismo de desdoblar la urea formando dos moléculas de amoníaco por acción de la enzima ureasa. El método de siembra e incubación fue el mismo que utilizamos en la prueba de citrato. Se consideró como positiva el cambio de color de amarillo a rojo rosado intenso en todo el tubo o solo en el pico de flauta. Por el contrario la prueba se consideró negativa por no existir cambio de color (amarillo)

✓ **SIM (Sulfhídrico, Indol, Movilidad)**

Permite determinar la movilidad, producción de ácido sulfhídrico e indol. Para esta prueba se tomó una colonia de 24 horas con el aguja del asa previamente esterilizada, se procedió a sembrar en el medio mediante una punción hasta la mitad, se incubó durante 24 horas a una temperatura de $35^{\circ}\text{C}\pm 2$. Trascurrido el tiempo se adicionó 4 gotas de reactivo de Kovacs se

observó los cambios que se produjo en el medio, la interpretación de los resultados se describe en el cuadro 12-2.

Cuadro 12-2 Interpretación de resultados en la prueba SIM

Movilidad	Indol	Producción de ácido sulfhídrico
Positivo Los organismos móviles migran de la línea de siembra provocan turbidez.	Positivo Ennegrecimiento del medio	Positivo Presencia de un anillo rojo en la superficie del medio
Negativo. Crecimiento bacteriano acentuado siguiendo la línea de siembra.	Negativo Sin ennegrecimiento del medio.	Negativo No se produce color o presenta un color naranja en la superficie del medio

Fuente: Bailón., et al 2015

- Identificación de la Colonia Bacteriana pura mediante galería MICROGEN™ GN-ID.

Para realizar esta identificación fue necesario que la colonia sea de 24 horas de cultivada, se procedió a realizar la prueba de oxidasa con el fin de determinar si ocupamos las dos tiras de posillos GNA+GNB (oxidasa positiva) o solamente una GNA (oxidasa negativa). La forma de utilización de la galería se detallan en la figura 27-2.

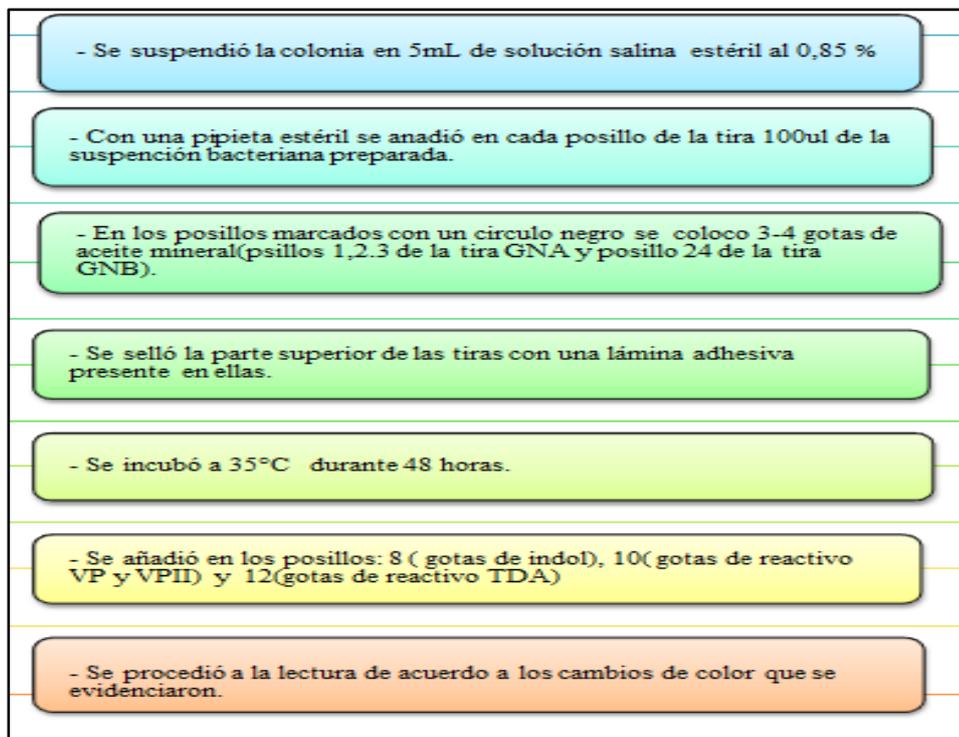


Figura 27-2 Forma de utilización de la Galería MICROGEN™ GN-ID.

Fuente: MICROGEN Bioproducts., 2004

Los resultados se agruparon de tres en tres y el perfil numérico obtenido al final se introdujo en el Software Microgen Identification System donde nos proporcionó resultados basados en % que permitió determinar la identidad del organismo aislado.

2.6.4 Pruebas de sensibilidad Antimicrobiana.

- El medio utilizado fue Agar Mueller-Hinton.
- Para realizar la prueba la colonia bacteriana debió ser de no más de 24 horas de cultivada.
- Se procedió a realizar una suspensión de la colonia en suero estéril al 0,85% ajustando la turbidez con la escala 0,5 de Mc-Farland equivalente a 10^8 UFC/mL.
- Con la ayuda de un hisopo estéril se sembró en toda la superficie de la caja petri, los discos se colocaron haciendo una pequeña presión a una distancia de 24mm uno del otro con la ayuda de una pinza. Los antimicrobianos utilizados dependieron del microorganismo aislado.
- Se incubó a $35^{\circ}\pm 2$ °C por 24 horas, se procedió a la lectura con la ayuda de una regla, el diámetro del halo de inhibición formado se relaciona con la resistencia o susceptibilidad del microorganismo frente al antibiótico.

2.6.5 Prueba Fenotípica para la determinación de Metalo β -Lactamasas.

- El medio de cultivo utilizado fue Agar Mueller-Hinton.
- Para la realización de esta prueba la colonia bacteriana debió ser de no más de 24 horas de cultivada.
- Se procedió a realizar una suspensión de la colonia en suero estéril al 0,85% ajustando la turbidez con la escala 0,5 de Mc-Farland.
- Con la ayuda de un hisopo estéril se sembró en toda la superficie de la caja petri. Los discos de imipenem y meropenem se colocaron en los extremos de la caja haciendo una pequeña presión con la ayuda de una pinza entre estos dos discos se colocó un disco en blanco el cual previamente se le impregnó con 10 μ L de EDTA al 0,5M.

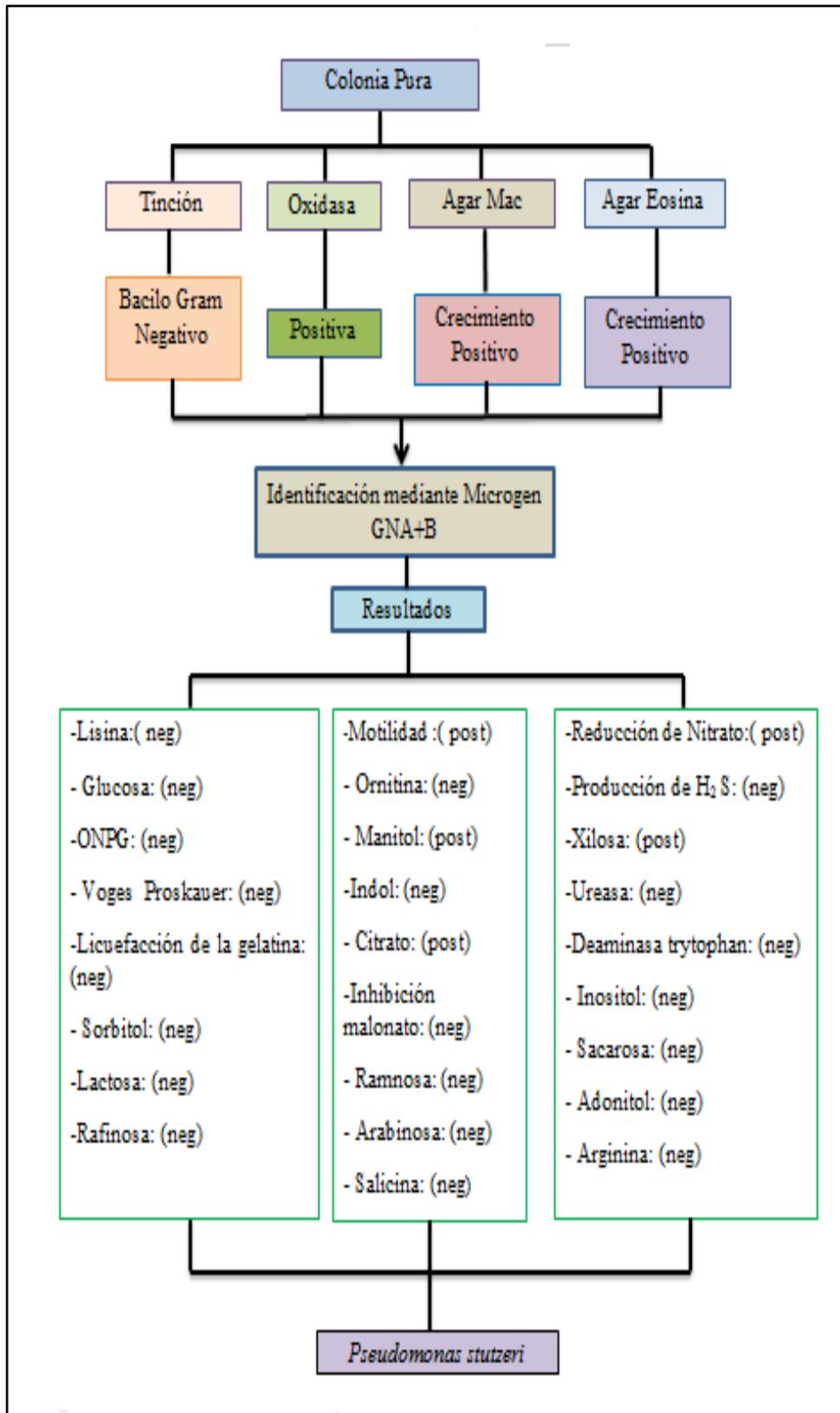


Figura 28-2 Esquema de identificación de *Pseudomonas stutzeri* mediante la galería MICROGEN™ GN-ID

Realizado por: Ramos, 2015

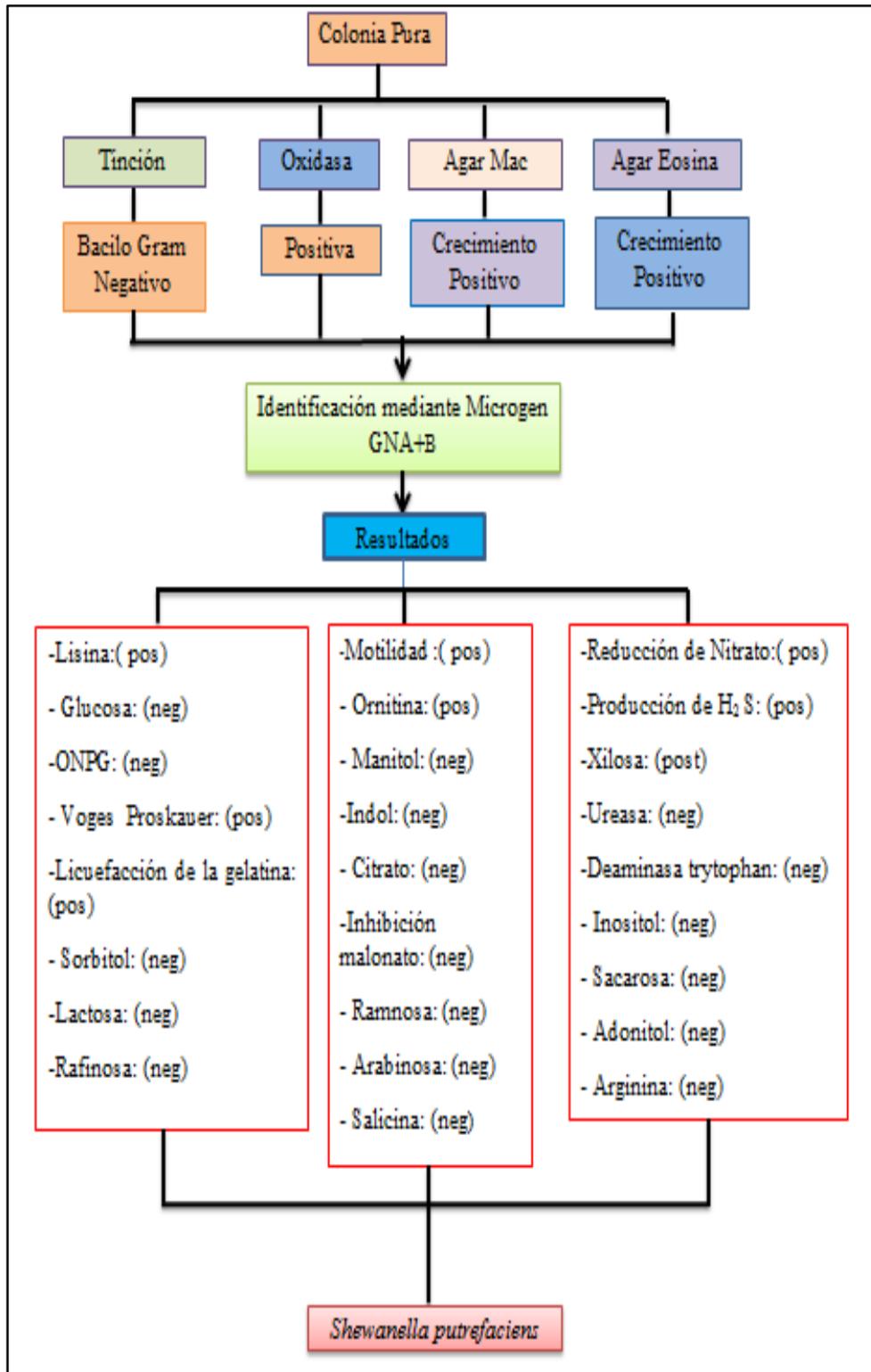


Figura 29-2 Esquema de identificación de *Shewanella putrefaciens* mediante MICROGEN™

Realizado por: Ramos, 2015

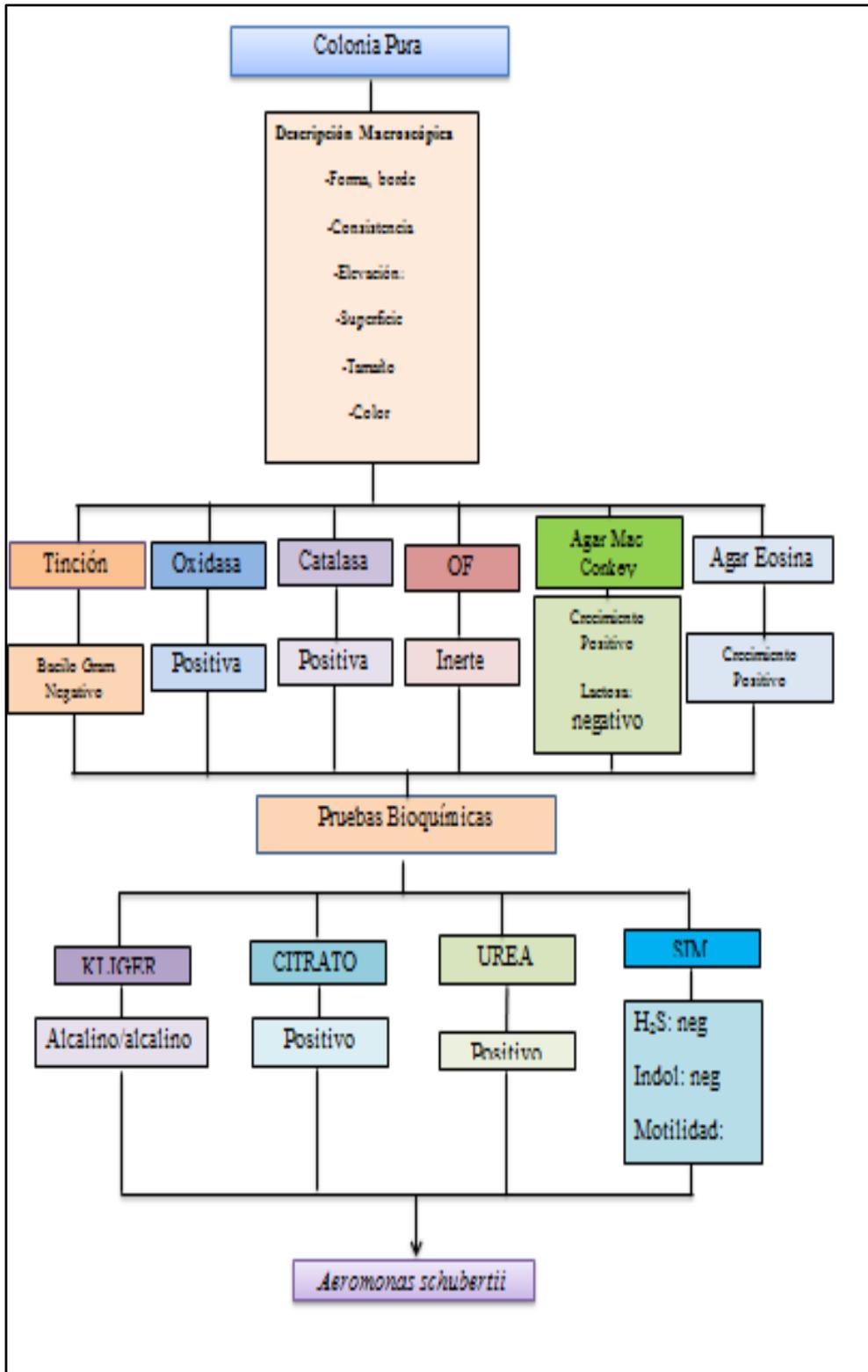


Figura 30-2 Esquema de identificación de *Aeromonas schubertii* mediante pruebas bioquímicas.

Realizado por: Ramos, 2015

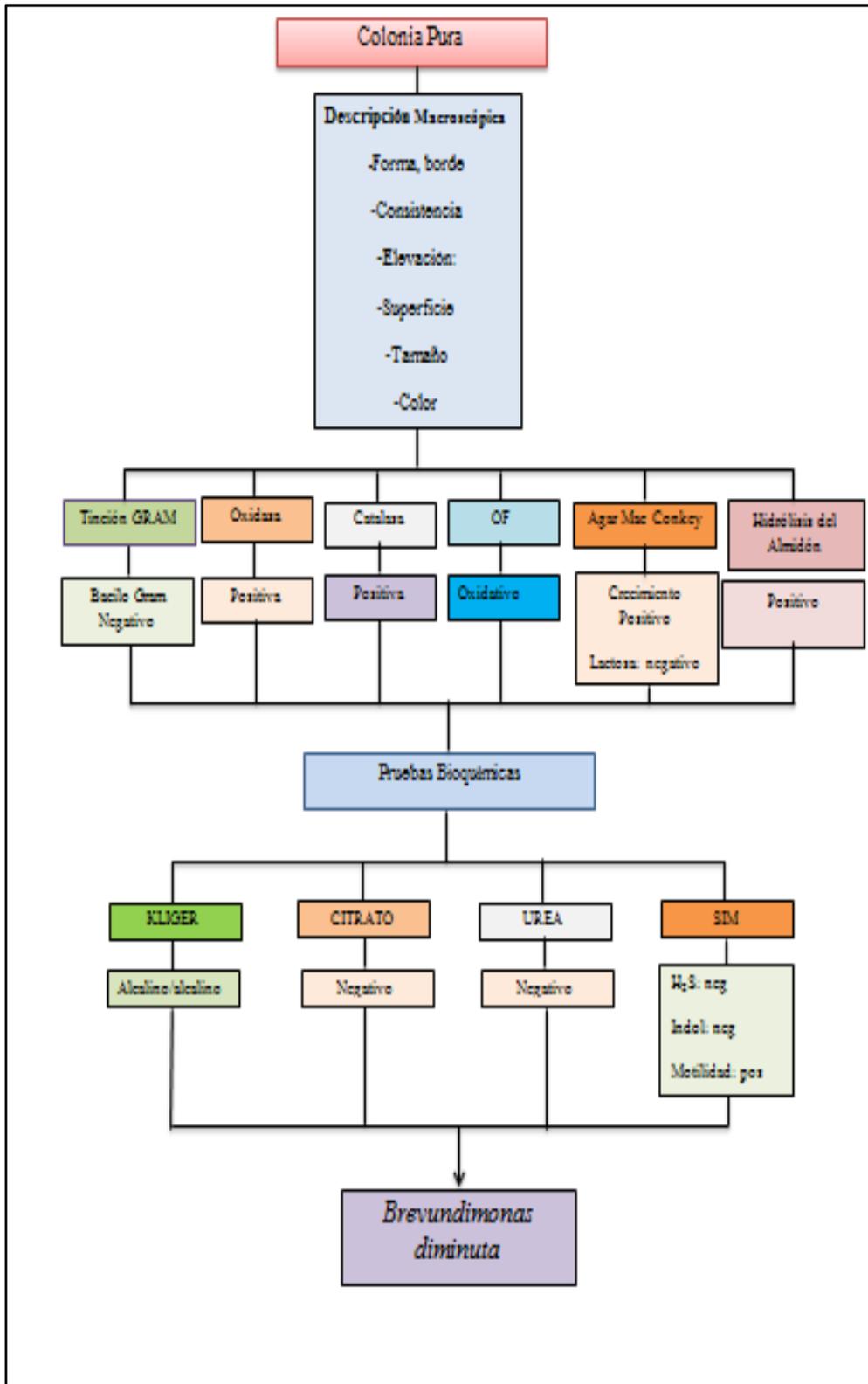


Figura 31-2 Esquema de identificación de *Brevundimonas diminuta* mediante pruebas bioquímicas.

Realizado por: Ramos, 2015

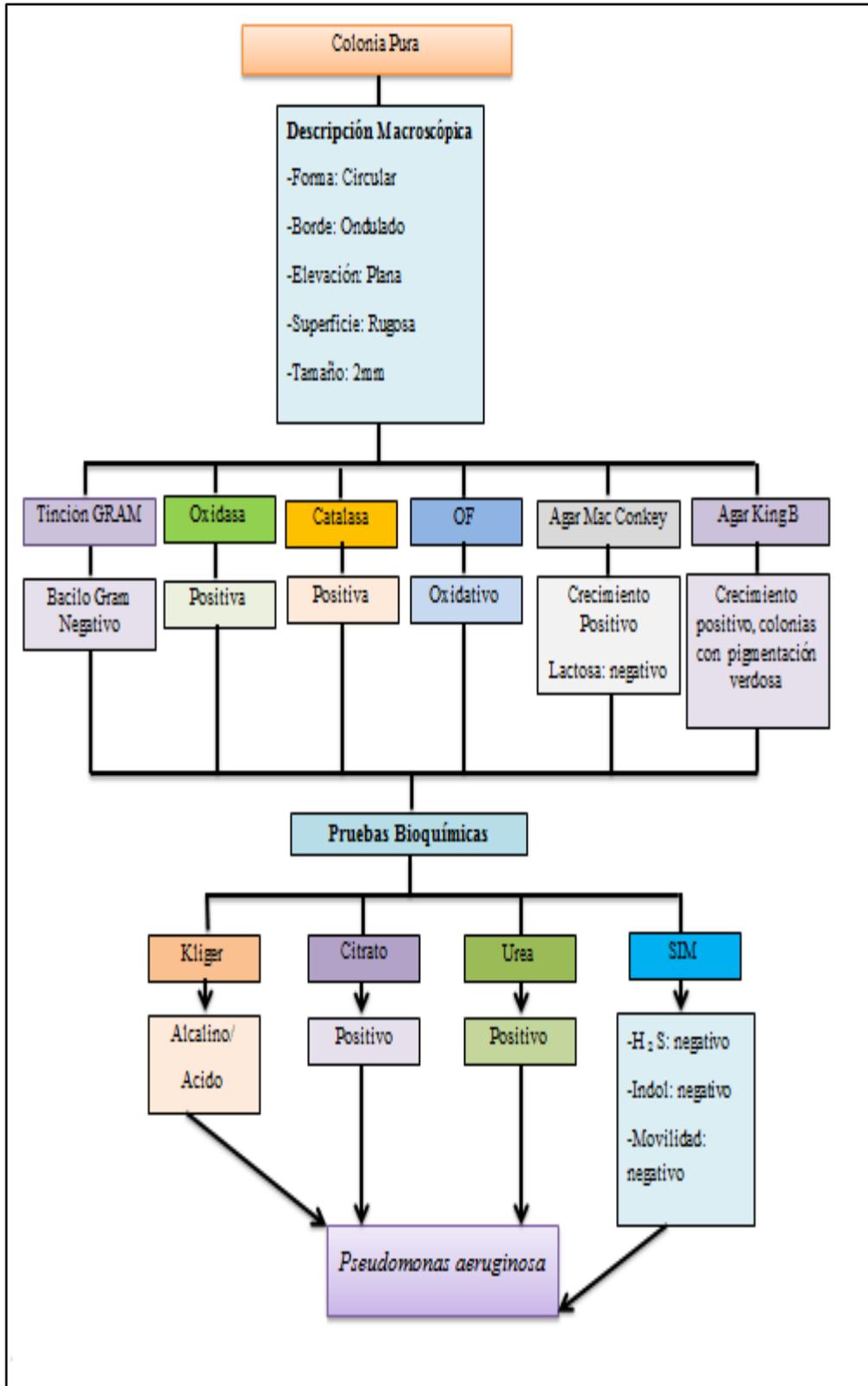


Figura 32-2 Esquema de identificación de *Pseudomonas aeruginosa* mediante pruebas bioquímicas.

Realizado por: Ramos, 2015

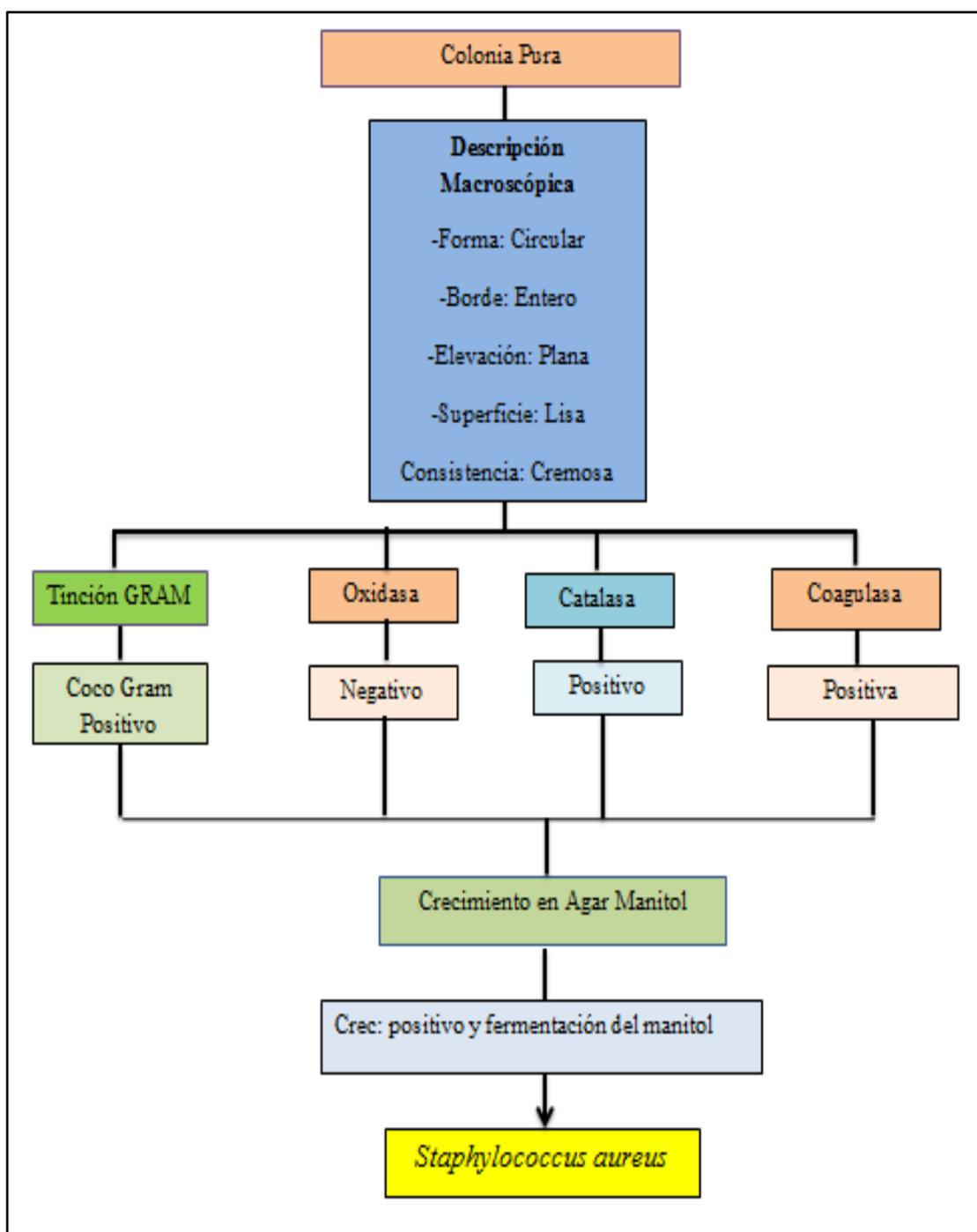


Figura 33-2 Esquema de identificación de *Staphylococcus aureus*.
Realizado por: Ramos, 2015

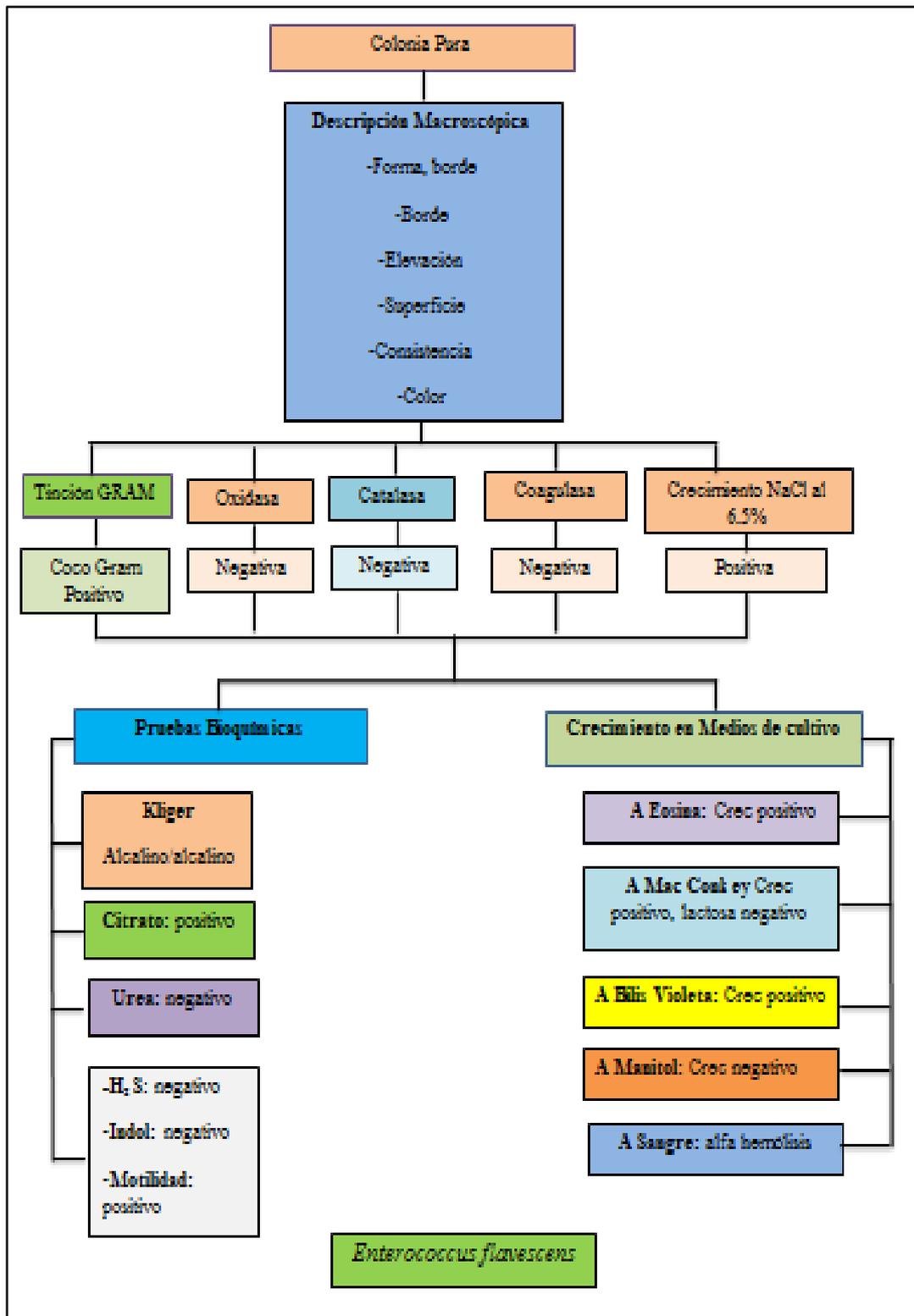


Figura 34-2 Esquema de identificación de *Enterococcus flavescens*.
Realizado por: RAMOS, 2015

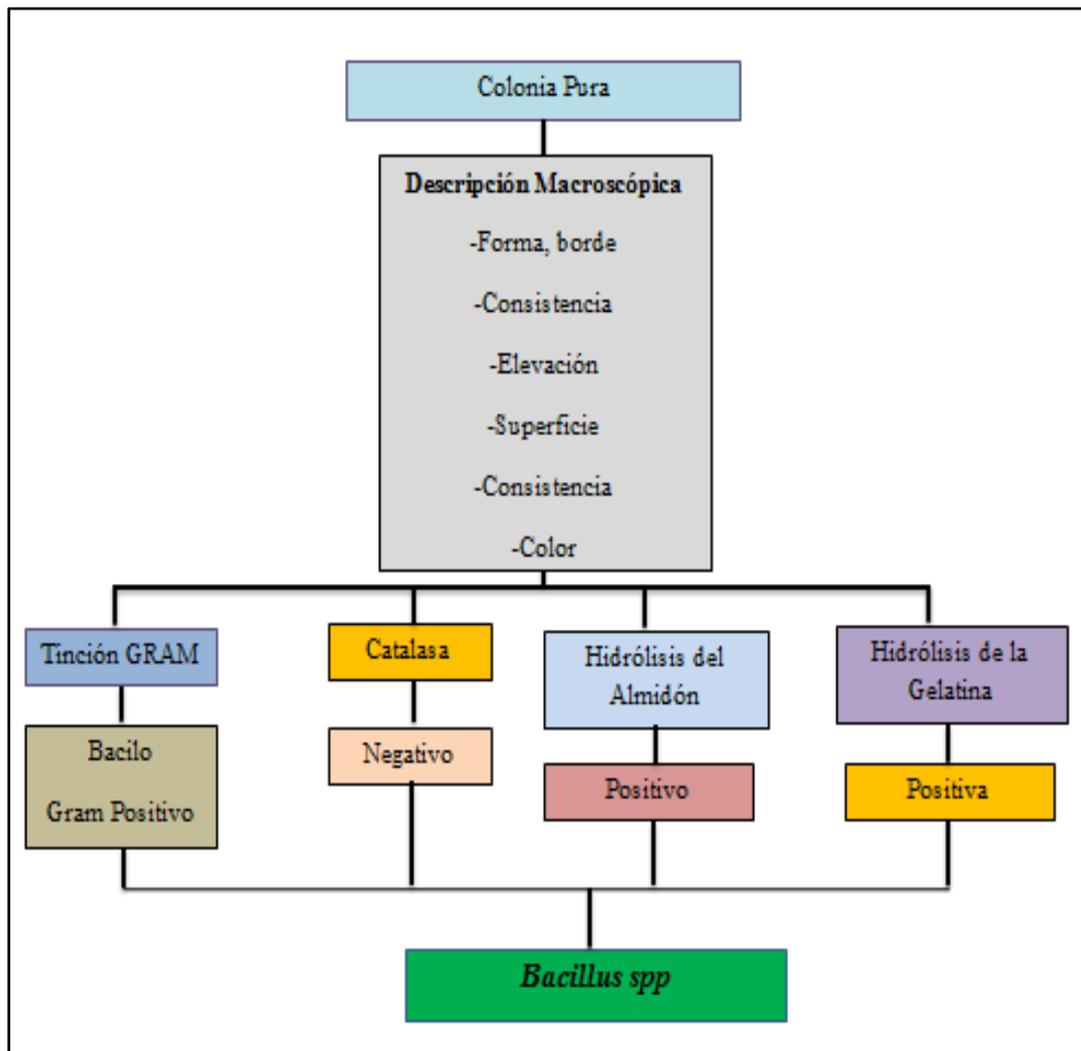


Figura 35-2 Esquema de identificación de *Bacillus* spp.
Realizado por: RAMOS, 2015

CAPÍTULO III

3. MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los resultados que se presentan en el presente trabajo corresponde a las determinaciones realizadas en el Balneario Termal de Yanayacu en dos puntos de donde emergen las aguas termales: manantial y piscina.

3.1 Parámetros *In Situ*

En la tabla 11-3 se detallan los resultados de los parámetros *in situ* en los dos puntos donde emergen las aguas termales del Balneario Yanayacu.

Tabla 11-3 Determinación de parámetros *in situ* del Manantial Termal del Balneario “Yanayacu” ubicado cantón la Troncal provincia de Cañar.

PARÁMETROS IN SITU	SITIO		PROMEDIO
	Fuente	Piscina	
Temperatura del Agua(°C)	48	48	48
Temperatura Ambiente (°C)	25	24	24,5
pH	9,0	9,0	9,0
Conductividad (µS/cm)	475	478	476,5
Sólidos Totales Disueltos (ppm)	304	305	304,5

Realizado por: Ramos, 2015

La temperatura promedio de las aguas del balneario fue de 48°C y la temperatura ambiental de 25°C esta diferencia permite considerarla como una agua termal (Fagundo et al., 2004) que define como aquella que posee una temperatura mayor 5 °C a la temperatura del ambiente

Son consideradas como aguas hipertermales aquellas con temperaturas entre 45°C- 50°C (Armijo et al., 1994) el agua del balneario cumple con esta definición por lo que se considera un agua hipertermal.

En el año 2013 el Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología (INAHMI) realizó un estudio físico-químico de las Aguas Termominerales en el Ecuador, la temperatura del agua del Balneario fue de 44,10 clasificándola como agua hipertermal siguiendo el criterio de (Schoeller,

1994). El resultado obtenido de la temperatura en nuestra investigación y por el (INAHMI, 2013) difirieren con 4°C debido a variaciones normales de la fuente.

EL pH puede ser un parámetro que límite el crecimiento de los microorganismos dado que la mayoría crecen en un pH comprendido ente 5-8. Un pH ácido o básico depende de la composición de minerales. El pH del agua termal fue de 9 que concuerda con el obtenido por el INAHMI .Entre las aguas termales estudiadas en España que presentan un pH cercano o superior al obtenido en nuestra investigación se encuentra: El Balneario de Panticosa (provincia de Huesca) con un pH 8,8 temperatura 45,3°C. El balneario termal Tolox localizado en Málaga con un pH de 9, 9 temperatura 20.8°C estos datos evidencia que el pH no depende de la temperatura del agua termal. (Vademécum de Aguas Mineromedicinales Españolas, 2000)

La conductividad esta relaciona directamente con la concentración de sólidos totales disueltos mientras mayor sea la concentración de sólidos totales disueltos mayor será la conductividad. El valor promedio obtenido en la investigación es de 476,5 µS/cm que se asemeja con el valor que consta en INAMHI 2013 de 485 µS/cm permitiendo clasificarla de acuerdo a (Rodier 1998) al agua termal del balneario como aguas de una mineralización media.

La Clasificación de las aguas por su salinidad es en base a los Sólidos Totales Disueltos presentes en ella. El valor de este parámetro fue de 304,5 (mg/mL) cercano al obtenido por el INAHMI (314mg/mL) clasificándola como aguas de salinidad media (STD entre 160-460 mg/mL) (INAHMI ,2013)

3.2 Recuento de Aerobios Mesófilos

Tabla 12-3 Recuento de Aerobios Mesófilos (UFC/mL) de las Aguas Termales del Balneario Yanayacu ubicado en el cantón La Troncal provincia de Cañar.

SITIO	NÚMERO DE UFC/MI	MEDIA \bar{x}	DESVIACIÓN ESTÁNDAR (Ds)	VARIANZA
Piscina	Muestra 1	3,12x10 ²	3,28x10 ²	134158,67
	Muestra 2	3,44 x10 ²		
Fuente	Muestra 1	9,64 x10 ²	9,62 x10 ²	
	Muestra 2	9,60 x10 ²		
PROMEDIO BALNEARIO		6,45 x10 ²		
Incubado a 48hrs(±3hrs) a 35°C±(1°C) AOAC método oficial 990.12				

Realizado por: Ramos, 2015

El número de aerobios mesófilos desde finales del siglo XIX ha sido utilizado como un indicador de calidad tanto de bebidas como de aguas subterráneas, cifras inferiores a 100 UFC /mL indica una buena protección del acuífero y no representan un riesgo sanitario. (Vademécum de Aguas Mineromedicinales Españolas, 2000)

En la tabla 12-3 se expresa los resultados obtenidos en el recuento de aerobios mesófilos de las dos muestras de aguas termales colectadas del Balneario Yanayacu presentando mayor número de UFC/mL en la fuente que en la piscina. El número de UFC/mL en la fuente fue de 962 UFC/mL correspondiendo al 75% y en la piscina de 328 UFC/mL que corresponde al 25% (grafico 1-3); esta variación de resultados puede deberse a que en la fuente (ojo de agua en contacto con el ambiente) no existe ninguna protección y tiene contacto directo con humanos y animales caso diferente al ojo de agua de la piscina.

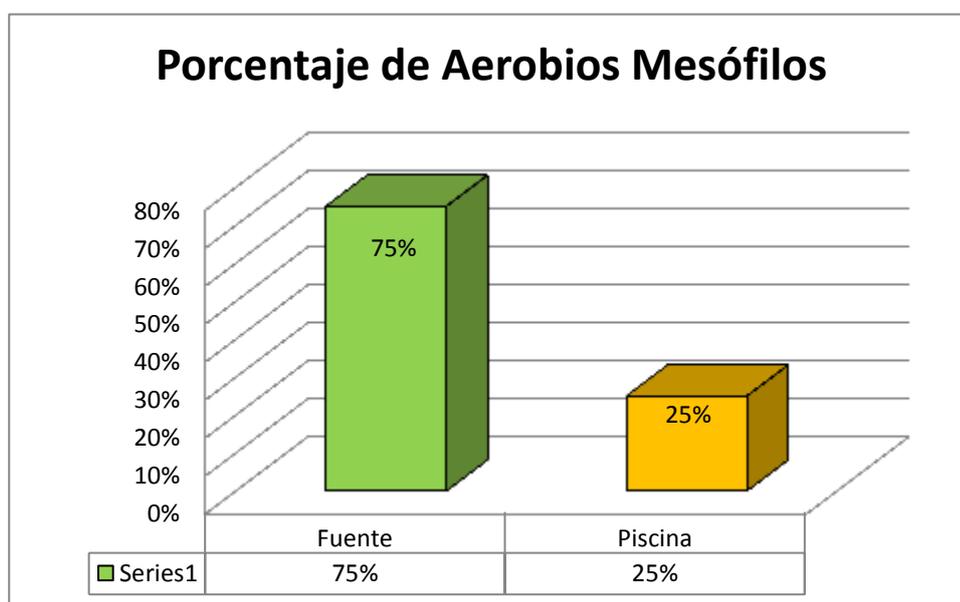


Gráfico 1-3: Porcentaje del Recuento de Aerobios Mesófilos (UFC/mL) de las Aguas Termales del Balneario Yanayacu.

Realizado por: Ramos, 2015

De la Rosa et al., 2001 efectuaron un estudio de la microbiología del agua mineromedicinal del Manantial El Salvador (temperatura de emergencia 14°C) del Balneario Paraíso de Manzanera (Teruel- España). En el estudio obtuvieron un número de bacterias viables entre 3-30 UFC/mL (la mayoría esporuladas) valores muy por debajo de los obtenidos en nuestra investigación lo que sugiere una buena protección de las aguas de ese manantial.

De la Rosa et al., 2007 efectuaron una investigación microbiológica del manantial de agua clorurada sódica mesotermal del Balneario Puentes Viesgo, España. En cuanto al número de bacterias heterótrofas oligotrofas viables y esporuladas a distintas temperaturas (22° C, 37° C y

45° C) fue inferior a 10 UFC/mL. Los valores obtenidos en el Balneario Yanayacu fueron de 962 UFC/mL en la fuente y en la piscina 328 UFC/mL valores que superan a los obtenidos en el del Balneario Puentes Viego.

En España Mosso et al., 2008 realizaron un estudio microbiológico de los manantiales mineromedicinales del Balneario de Valdelateja (Termas y Río) con el fin de investigar la presencia de microorganismos de interés sanitario y determinar la diversidad microbiana. Los resultados de la investigación en cuanto a bacterias heterótrofas, oligotrofas viables y esporuladas fue inferior a 100 UFC/mL.

De la Rosa et al., 2009 estudiaron la microbiología de los manantiales mineromedicinales Baños y Baños de Abajo del Balneario de Alicún de las Torres (Granada) encontrando que las bacterias heterótrofas y oligotrofas viables a 22 °C y 37 °C fue inferior a 100 UFC/mL

Todos estos estudios mencionados presentan valores inferiores a 100 UFC/mL lo que indica una buena protección de los manantiales. En relación a nuestro estudio los valores se encuentran por encima de 100 UFC/mL (962 UFC/mL fuente y 328 UFC/mL piscina) estos valores nos indican que no existe una adecuada protección de la fuente que debido a la localización es muy vulnerable a la contaminación (aguas de infiltración como consecuencia de la presencia de un río) así como la intervención del hombre sobre el entorno en donde se encuentra.

3.3 Recuento de *Escherichia coli* / coliformes.

Tabla 13-3 Recuento de *Escherichia coli* / coliformes (UFC/mL) de las Aguas Termales del Balneario Yanayacu ubicado en el cantón La Troncal provincia de Cañar.

SITIO		Coliformes (C)	<i>Escherichia coli</i> (<i>E.coli</i>)	MEDIA (\bar{x}) (C) UFC/mL	MEDIA (\bar{x}) (CF) UFC/mL <i>E.coli</i>
Fuente	M1	7,4x10 ¹	1,0x10 ⁰	7,8x10 ¹	1,0 x10 ⁰
	M2	8,2x10 ¹	1,0x10 ⁰		
Piscina	M 1	4,0x10 ⁰	0 ⁰	4,5x10 ⁰	0
	M 2	5,0x10 ⁰	0		
PROMEDIO BALNEARIO				4,13x10¹	0,5

Realizado por: Ramos, 2015

Las aguas termales del Balneario Yanayacu al ser utilizadas con fines terapéuticos no deben suponer un riesgo para la salud de quienes la utilizan, por lo que no debe existir presencia de bacterias que indiquen contaminación de origen fecal ni de microorganismos que puedan transmitirse por el agua.

En la tabla 13-3 se muestran los resultados obtenidos en el recuento de *Escherichia coli* /coliformes, los valores de las muestras 1 y 2 para cada punto de emergencia concuerdan entre sí. El valor obtenido de coliformes en la fuente es de 78 UFC/mL y en la piscina de 5 UFC/mL obteniendo un promedio de coliformes en el balneario de 41 UFC/mL y de coliformes fecales de 0,5 ufc/mL (gráfico 2-3)

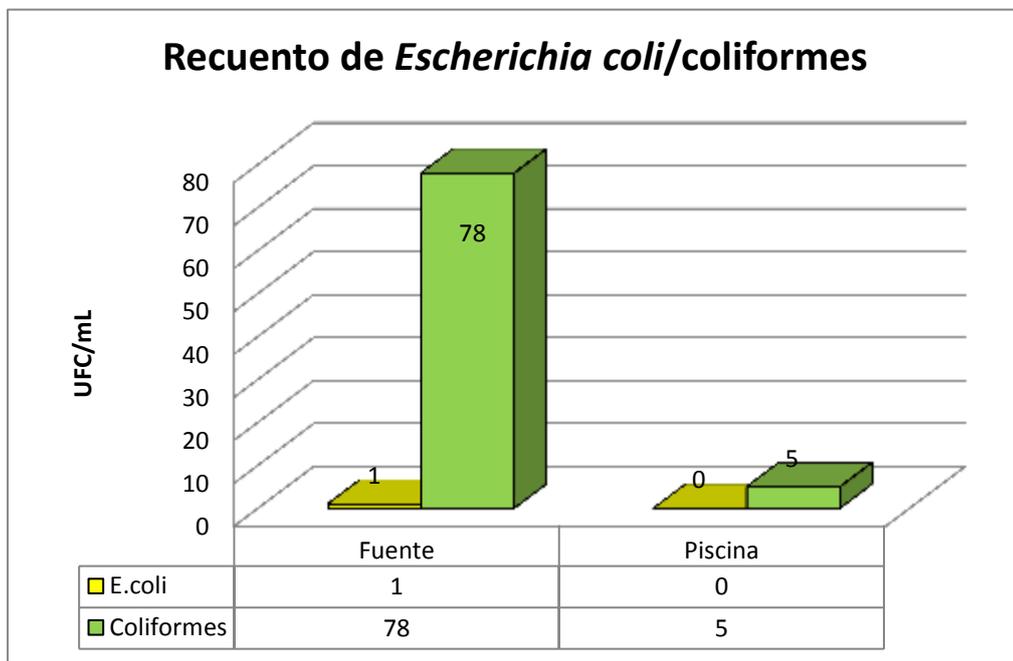


Gráfico 2-3 Recuento de *Escherichia coli*/ coliformes (UFC/mL) de las Aguas Termales del Balneario Yanayacu ubicado en el cantón La Troncal provincia de Cañar.
Realizado por: Ramos, 2015

Esta diferencia de valores en los dos puntos de donde emergen las aguas termales tanto de *Escherichia coli* como de coliformes se debe al lugar en donde se encuentran, ya que el un punto al estar en contacto directo con el ambiente el origen de *Escherichia coli* y coliformes podría deberse a la presencia animal o humana en cambio en el otro punto el origen de los coliformes puede deberse a las aguas de infiltración y la ausencia de *Escherichia coli* en la piscina se debe a la nula existencia de contacto animal o humano. De acuerdo al Boletín Oficial de Canarias 1989 no debe existir presencia de coliformes fecales y el límite de coliformes totales es de 10UFC/mL en base a este criterio solo la piscina cumple con esta exigencia.

De la Rosa et al., 2009 efectuaron un estudio de los manantiales termales del Balneario de Alicún de las Torres, en la Provincia de Granada donde investigaron microorganismos de interés sanitario como el recuento de coliformes totales y fecales determinando que los manantiales Baños y Baños de abajo no presentan microorganismos indicadores de contaminación fecal en 100 mL de agua cumpliendo con la normativa española de aguas de consumo humano y aguas de bebidas envasadas. En nuestra investigación el resultado de *Escherichia coli* (coliformes fecales) de la piscina concuerda con lo obtenido en el estudio lo que indica que el agua obtenida de ese punto cumple con la normativa.

Yepes, 2004 realizó un estudio de la calidad microbiológica y físico-química de las aguas utilizadas con fines recreativos de las Playas de Bocagrande y Marbella en Cartagena de Indias (Colombia) en cuanto a parámetros microbiológicos el promedio de coliformes totales superó el rango normal, permitiéndole concluir que la calidad microbiológica de estas aguas podría estar asociada a la aparición de enfermedades. Por consiguiente en nuestro estudio la fuente presenta una mínima cantidad de coliformes que podría ocasionar enfermedades, el uso de este sitio sería responsabilidad del usuario ya que no tiene una infraestructura adecuada (no es piscina)

De la Rosa et al., 2007 efectuaron una investigación microbiológica del manantial de agua clorurada sódica mesotermal del Balneario Puentes Viesgo, España con el interés de determinar la presencia de microorganismos patógenos e indicadores de contaminación, además de cuantificar y caracterizar la microbiota autóctona. No hallaron indicadores fecales ni microorganismos patógenos, lo que les permitió concluir que el agua de este manantial no supone un riesgo para la salud de los usuarios. El resultado de ese estudio referente a indicadores fecales coincide con el obtenido en la piscina en el que hay ausencia no así en la fuente que presenta 1 UFC/mL pudiendo aplicar medidas que eviten esa mínima contaminación y el usuario pueda utilizarla sin que le ocasione problemas en la salud.

En España Mosso et al., 2008 realizaron un estudio microbiológico de los manantiales mineromedicinales del Balneario de Valdelateja (Termas y Río) con el fin de investigar la presencia de microorganismos de interés sanitario y determinar la diversidad microbiana. No se encontraron indicadores fecales ni microorganismos patógenos, asegurando de esta manera que las aguas de los manantiales no suponen un riesgo para la salud de manera general las aguas termales de España se encuentran en constante control con el fin de salvaguardar la salud de quienes la utilizan razón que en los múltiples estudios revisados no existe presencia de coliformes fecales.

3.4 Recuento de *Staphylococcus* (UFC/mL).

Tabla 14-3 Recuento de *Staphylococcus* (UFC/mL) de las Aguas Termales del Balneario Yanayacu ubicado en el cantón La Troncal provincia de Cañar.

RECUESTO DEL GÉNERO <i>STAPHYLOCOCCUS</i> (UFC/mL)					
SITIO		Colonias rojo – violeta UFC/mL	Media (\bar{x})	Colonias azul-verde UFC/mL	Media (\bar{x})
Fuente	M 1	0	0	$2,69 \times 10^2$	$2,74 \times 10^2$
	M 2	0		$2,78 \times 10^2$	
Piscina.	M 1	2×10^0	1×10^0	1	2×10^0
	M 2	0		3	
Incubado a 48hrs(± 3 hrs) a 35°C(± 1 °C) AOAC método oficial 990.12 Colonias azul - verde (no es <i>S. aureus</i>) Colonias rojo-violeta (son <i>S. aureus</i>)					

Realizado por: Ramos, 2015

En la tabla 14-3 se indica los valores obtenidos del recuento del género *Staphylococcus* en los dos puntos donde emergen las aguas termales del Balneario Yanayacu. La presencia en la fuente de este género fue de $2,74 \times 10^2$ UFC/mL, no hubo presencia de la especie *Staphylococcus aureus*. En cuanto al recuento de este género en la piscina fue bajo 2×10^0 UFC/mL, la presencia de la especie *S. aureus* fue de 1×10^0 UFC/mL, lo que indica que hay mayor número de este género en la fuente (figura 3-3) esto se debe a que este punto tiene contacto directo con el ambiente en donde esta especie se encuentra ampliamente distribuida, formando parte de la flora bacteriana propia.

El género *Staphylococcus aureus* solo se ha encontrado en la piscina en un número muy reducido es un especie que resiste condiciones diversas, por lo que formaría parte de flora propia del agua termal ya que el punto de donde emerge no tiene contacto con especie humana.

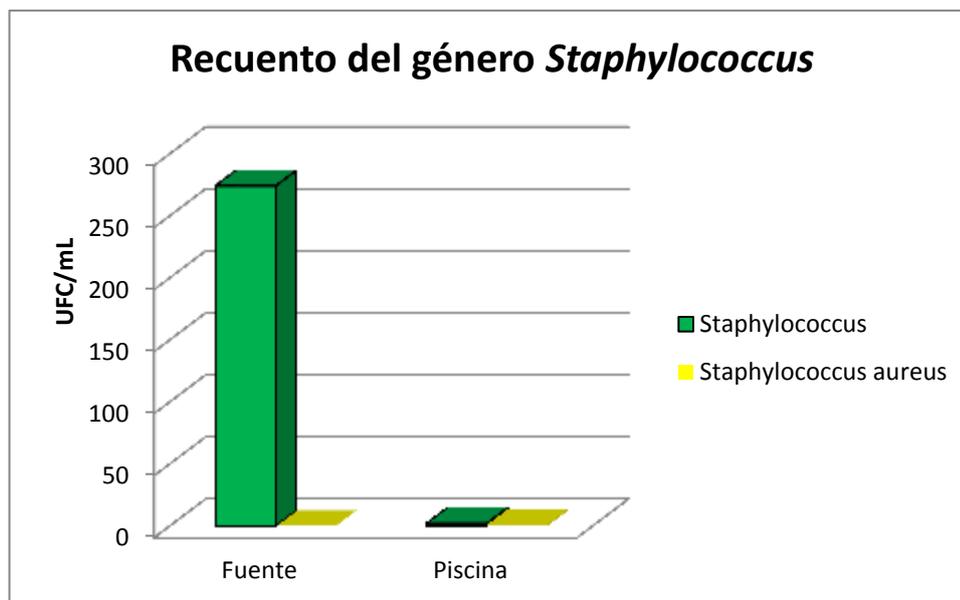


Gráfico 3-3 Recuento del género *Staphylococcus* en los dos puntos donde emergen las aguas termales del Balneario Yanayacu

Realizado por: Ramos, 2015

MARTÍN et al., 1992 realizaron un estudio microbiológico y químico del agua de las Piscinas de la Isla de Tenerife sometida una de ellas a cloración y filtración. Entre los parámetros microbiológicos que analizaron fue el recuento *Staphylococcus aureus* encontrando la presencia de 15 UFC/mL demostrando la resistencia de esta especie a altas concentraciones salinas por lo que concluyeron que este recuento debería tomarse como indicador microbiológico dentro de la calidad sanitaria de las aguas por las diversas patologías que pudiera causar en la especie humana. En nuestro estudio la cantidad encontrada en uno de los dos puntos donde emerge el agua termal fue inferior (1 UFC/mL), además difiere en cuanto a la procedencia y tratamiento ya que la analizada en este estudio por Martin et al fue en aguas sometidas a cloración, en nuestro caso es del punto donde emerge el agua sin tratamiento previo, pudiendo decirse que es la microflora propia del agua termal.

Alvarenga et al., 2012 determinaron la calidad microbiológica del agua de las piscinas ubicadas en el Complejo Deportivo de la Ciudad de Merliot y el Polideportivo de la Universidad de el Salvador durante tres meses del año 2011. La probabilidad de que encontrarán *Staphylococcus aureus* era alta ya que el cuerpo humano constituye un reservorio y los bañistas al nadar pudieran haber dejado esta especie en el agua formando películas en las superficies de las piscinas, los resultados de la investigación fue ausencia, de manera que afirmaron que las concentraciones de cloro eran las adecuadas para lograr contrarrestar la proliferación de esta especie, por lo que no representa un riesgo para la salud de los usuarios, estos resultados fueron contrarios a los de nuestra investigación encontrándose mínimas cantidades en la piscina (1UFC/mL).

Mosso et al., 2011 efectuaron un estudio microbiológico de los manantiales Mineromedicinales del Balneario de Baños de la Concepción en donde determinaron la presencia de bacterias heterótrofas, indicadores de contaminación fecal para lo cual realizaron recuento de coliformes totales, coliformes fecales, *enterococcus*, esporas de *Clostridium* sulfito- reductores y *C. perfringens*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa* además de *Staphylococcus aureus* dando como resultado: presencia del bacilos gram negativos (60%), bacilos gram positivos(29,6%),cocos gram positivos(10,4%) del género *Staphylococcus* (baja proporción) y ausencia de indicadores de contaminación por lo que concluyeron que estas aguas cumplen con las normativas de aguas para consumo humano y aguas de bebida envasada. En relación a nuestro estudio tanto en la fuente como en la piscina se encontró el género *Staphylococcus* siendo mayoritaria en el primer punto ya que estos microorganismos son ubicuos y se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza.

Mosso et al., 2006 estudiaron la microbiota del agua mineromedicinal del Balneario de Cervantes obteniendo un bajo recuento del género *Staphylococcus* estos provinieron del aire, suelo y lluvia por lo que podemos manifestar que la razón que en un punto donde emerge el agua termal de nuestro Balneario en estudio el conteo sea muy alto (274 UFC/mL) con respecto al otro fue (1 UFC/mL) por el contacto directo con el medio ambiente.

3.5 Recuento de Mohos y Levaduras (UFC/mL)

Tabla 15- 3 Recuento de Mohos y Levaduras (UFC/mL) de las Aguas Termales del Balneario Yanayacu ubicado en el cantón La Troncal provincia de Cañar.

SITIO	LEVADURAS	MOHOS	Media \bar{x}	Media \bar{x}
			LEVADURAS	MOHOS
Fuente	M1	5,0 x10 ⁰	7,5 X10 ⁰	0
	M 2	1,0x10 ¹		
Piscina.	M1	0	0	0
	M 2	0		
PROMEDIO DEL BALNEARO		3,75X10 ⁰	0	

Realizado por: Ramos, 2015

En la tabla 15-3 se indica el recuento de mohos y levaduras en los dos puntos donde emergen las aguas termales del Balneario Yanayacu. Encontrándose la presencia de levaduras solo en la fuente con una media de los dos muestreos de 7,5 UFC/mL, estos microorganismos proceden del suelo y este punto tiene contacto directo ya que es un espacio creado de improviso por los bañistas. No hubo presencia de mohos en ninguno de los sitios muestreados (gráfico 4-3). Por

consiguiente el promedio de levaduras en el Balneario fue de 3,75 UFC/mL y ausencia de levaduras.

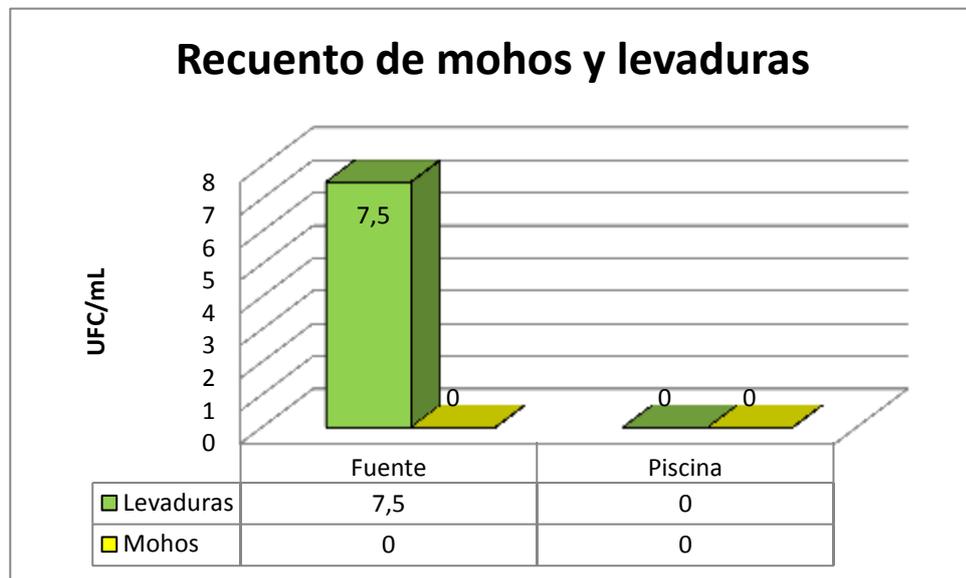


Gráfico 4-3 Recuento de Mohos y Levaduras (UFC/mL) en dos puntos donde emergen las aguas termales del Balneario Yanayacu.

Realizado por: Ramos, 2015

Mosso et al., 2011 realizaron un estudio microbiológico de los manantiales Mineromedicinales del Balneario de Baños de la Concepción para ello hicieron el recuento de hongos y efectuaron la identificación siguiendo los criterios de Pitt y Hocking. Dando como resultado en el Manantial Las Cuevas de 5 UFC/100mL y en el manantial Las Bombas de 26 UFC/100mL encontraron hongos filamentosos en el manantial Cuevas de los géneros *Penicillium*, *Acremonium*, y *Alternaria*.

De La Rosa et al., 2009 estudiaron la microbiología de los manantiales Mineromedicinales del Balneario de Alicún de las Torres. El recuento de hongos lo realizaron por el método de filtración utilizando agar sabourand con cloranfenicol 0,05%. Encontraron en el manantial Baños 2 UFC/100mL y en el manantial Baños de Abajo 600 UFC/100mL. Los hongos filamentosos que hallaron en el manantial fueron identificados basándose en la morfología de las colonias y observación macroscópica de las hifas, esporangios y esporas utilizando criterios de Pitt y Hocking. En el manantial Baños de Abajo los géneros encontrados fueron *Penicillium*, *Fusarium* y *Alternaria*. En nuestro estudio solo hubo presencia de hongos en la fuente de 7,5UFC/mL suponemos que estos microorganismos se encuentran en el suelo y en el ambiente y de allí pasan a la fuente.

En el 2013 De la Rosa et al, efectuaron un estudio microbiológico del agua mineromedicinal del Balneario El Reposo en donde encontraron la presencia de hongos en un número muy reducido indicando que la presencia de estos organismos es poco frecuente, ya que la gran mayoría provienen del suelo siendo capaces de adaptarse al medio acuático.

3.6 Morfología macroscópica de las colonias bacterianas obtenidas de las aguas termales del balneario Yanayacu

Tabla 16-3 Características macroscópicas de las colonias bacterianas aisladas de las aguas Termales del balneario Yanayacu.

N° Clon	MORFOLOGIA MACROSCOPICA DE LAS COLONIAS BACTERIANAS						
	Colonia	Borde	Elevación	Superficie	Consistencia	Color	Tamaño
1	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Cremosa	Amarilla	3 mm
2	Irregular	Ondulado	Plana	Rugosa	Membranosa	Crema-	2 mm
3	Irregular	Rizada	Elevada	Lisa	Cremosa	Traslucida	4mm
4	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Cremosa	Amarillo	6 mm
5	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Cremosa	Crema- color hueso	3 mm
6	Circular	Entero	Plana	Lisa	Cremosa	Durazno	8 mm
7	Circular	Entero	Plana	Lisa	Cremosa	Durazno	3 mm
8	Rizoide	Rizada	Elevada	Rugosa	Membranosa	Crema	5 mm
9	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Cremosa	Amarilla	1,2 cm
10	Circular	Entero	Plana	Lisa	Cremosa	Crema	5mm
11	Irregular	Ondulado	Plana	Rugosa	Membranosa	Crema	7mm
12	Irregular	Ondulado	Plana	Rugosa	Membranosa	Crema	9mm
13	Irregular	Ondulado	Plana	Lisa	Cremosa	Crema	2cm
14	Irregular	Ondulado	Plana	Lisa	Cremosa	Crema	5mm
15	Rizoide	Ondulado	Plana	Rugosa	Membranosa	Traslúcida	5mm
16	Circular	Entero	Plana	Lisa	Cremosa	Durazno	5mm
17	Circular	Entero	Plana	Lisa	Cremosa	Durazno	4mm
18	Irregular	Ondulado	Plana	Rugosa	Cremosa	Durazno	6m

.....(Continúa)

19	Irregular	Ondulado	Elevada	Lisa	Cremosa	Durazno	3mm
20	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Cremosa	Crema	9mm
21	Circular	Entero	Plana	Lisa	Cremosa	Crema	4mm
22	Irregular	Rizada	Plana	Rugosa	Membranosa	Crema	6mm
23	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Cremosa	Amarilla	5mm
24	Irregular	Rizada	Elevada	Lisa	Cremosa	Crema	4mm
25	Irregular	Ondulado	Plana	Lisa	Cremosa	Crema-color hueso	3mm
26	Irregular	Ondulado	Plana	Lisa	Cremosa	Crema-color hueso	3mm
27	Irregular	Entero	Plana	Rugosa	Membranosa	Amarillo	3mm
28	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Cremosa	Crema-color hueso	6mm
29	Irregular	Ondulado	Elevada	Lisa	Cremosa	Crema	3mm
30	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Cremosa	Crema	3mm
31	Circular	Ondulado	Elevada	Lisa	Cremosa	Crema	5mm
32	Irregular	Ondulado	Plana	Lisa	Rugosa	Membranosa	4mm
33	Circular	Entero	Plana	Lisa	Cremosa	Crema	5mm
34	Circular	Entero	Plana	Lisa	Cremosa	Crema	3mm

Realizado por: Ramos, 2015

En la tabla 16-3 se indican los clones aislados del agua termal del Balneario Yanayacu dando un total de 34 clones, a los cuales se realizó repiques para la estabilización del aislado bacteriano. Algunos clones se perdieron durante el repique.

3.7 Bacilos gram negativos, cocos y bacilos gram positivos aislados del Balneario Yanayacu

Tabla 17-3 Número de bacilos gram negativos, cocos y bacilos gram positivos aislados del Balneario Yanayacu.

SITIO	Clones GRAM (-)		Clones GRAM (+)
	Bacilos	Cocos	Bacilos
Fuente	8	3	3
Piscina	15	4	1
TOTAL	23	7	4

Realizado por: Ramos, 2015

En la tabla 17-3 se indica el número de bacilos gram (-), cocos y bacilos gram (+) aislados por cada punto de donde emergen las aguas termales del Balneario.

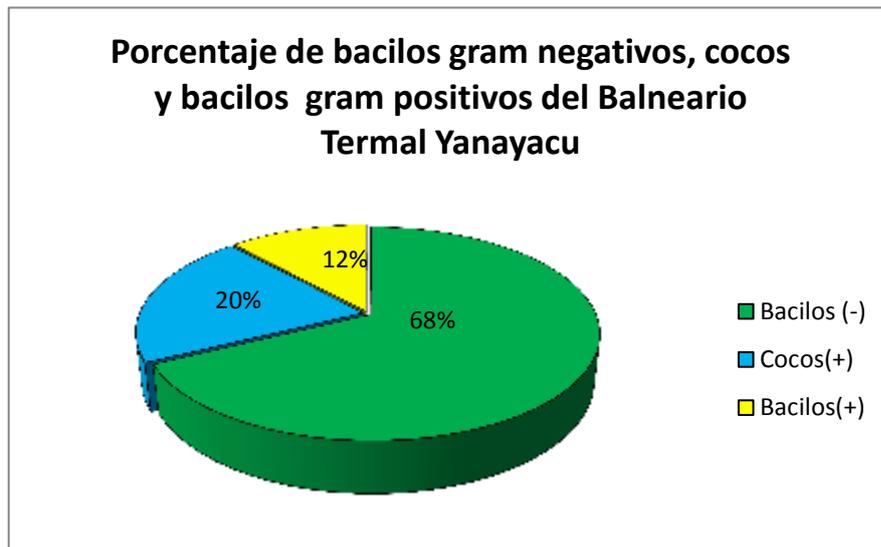


Gráfico 5-3: Porcentaje de bacilos gram (-), cocos y bacilos gram (+) en las aguas termales del Balneario Yanayacu

Realizado por: Ramos, 2015

En el año 2012 Borja et al estudiaron las bacterias halotolerantes productoras de hidrolasas aisladas de las aguas termales de Tarapoto-Perú en donde obtuvieron un predominio de bacterias gram negativas de tipo morfológico bacilos en un 93% que concuerda con el presente estudio investigativo donde hubo presencia mayoritaria de clones gram negativos en un 68%.

Toriya et al.,2002 estudiaron la microbiología de las aguas del Balneario Alhama de Granada la temperatura promedio del agua fue de 40°C .Las cepas que aislaron corresponde a bacilos gram positivos (49,1%), cocos gram positivos (30,2%) y bacilos gram negativos (20,7%) predominando las bacterias gram positivas por su resistencia a las altas temperaturas y concentraciones de sales En nuestro estudio la temperatura del agua termal fue 48°C se obtuvo una mayor presencia de bacilos gram negativos 68% seguido de cocos gram positivos en un 20% y de bacilos gram positivos en un 12% Estos resultados difieren con los resultados de la investigación de Toriya et al en cuanto a la presencia mayoritaria de bacilos gram negativos que pudo deberse a que el balneario termal Yanayacu se encuentra a lado de un río y estos microorganismos gram negativos pudieron provenir de aguas superficiales o ser propios de la microbiota autóctona.

De La Rosa et al.,2009 efectuaron un estudio microbiológico de las aguas termales del Balneario de Alicún de las Torres con una temperatura de 34°C obteniendo 60 cepas de bacterias viables heterótrofas y oligotrofas de las cuales 54,5% corresponden a bacilos gram

negativos, 29,1% bacilos gram positivos y 16,4% cocos gram positivos. En el Balneario Alicún la presencia de bacilos positivos fue de 29,1% con respecto a un 12% obtenido en el Balneario Termal Yanayacu. En cuanto a cocos gram positivos mayor presencia se evidencia en el Balneario Termal Yanayacu 20% con respecto a un 16,4% en el Balneario Alicún de las Torres.

De La Rosa et al.,2004 efectuaron un estudio microbiológico del Balneario de Jaraba en donde aislaron 254 cepas de bacterias heterótrofas de ellas el 96,1% corresponde a bacilos gram negativos,17,3% cocos gram positivos y 13,8% a bacilos gram positivos concordando con los resultados obtenidos en nuestra investigación respecto a la presencia mayoritaria en porcentaje de bacilos gram negativos.

De los 34 clones obtenidos se seleccionó 13 en base a las características macroscópicas (tabla 18-3) donde observamos que en la fuente las cepas puras fueron inferiores a las cepas aisladas de la piscina una las razones fue la falta crecimiento de algunas cepas.

Tabla 18-3 Número de bacilos gram negativos, cocos y bacilos gram positivos seleccionados del Balneario Yanayacu para la identificación.

SITIO	NÚMERO DE BACTERIAS GRAM (+)		NÚMERO DE BACTERIASGRAM (-)
	Bacilos	Cocos	Bacilos
Fuente	1	3	2
Piscina	0	1	6
TOTAL	5		8

Realizado por: Ramos, 2015

3-8 Identificación de los Clones puros Aislados

Tabla 19-3 Pruebas bioquímicas de los clones puros bacilos gram negativos aislados de las aguas termales del Balneario Yanayacu.

	CLON	8	9	11	12	14	15	18
	Punto de muestreo	Fuente	Piscina	Piscina	Piscina	Piscina	Piscina	Piscina
	Tinción Gram	Bacilo (-)	Bacilo (-)	Bacilo (-)	Bacilo (-)	Bacilo (-)	Bacilo (-)	Bacilo (-)
PRUEBAS	Catalasa	Post	Post	Post	Post	Post	Post	Post
	Oxidasa	Post	Post	Post	Post	Post	Post	Post
	OF	Oxid	Oxid	Oxid	Ferm/ Oxid	Oxid	Oxid	Oxid
	Kligler	Alc/Ac	Alc/Alc	Alc/Alc	Alc/Alc	Alc/Ac	Alc/Alc	Alc/Alc
	Movilidad	Neg	Neg	Post	Post	Post	Post	Post
	Indol	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	H₂S	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Urea	Post	Neg	Neg	Post	Neg	Neg	Neg
	Citrato	Post	Post	Post	Post	Neg	Neg	Post
OTROS	Mac Conkey	Crec	Crec	Cre	Cre	Crec	Crec	Crec
	EAM	Crec	Crec	Crec	Crec	Crec	Crec	Crec
	Agar King B	Crec	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Género y Especie	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	<i>P. stutzeri</i>	<i>Aeromonas schubertii</i>	<i>Brevundimonas diminuta</i>	<i>Shewanella putrefaciens</i>	<i>B. diminuta</i>	
Alc/Ac: alcalino/ácido		Ac/Ac: ácido/ácido		post: positivo		neg: negativo		
Crec: crecimiento		oxid: oxidativo		Ferm: fermentativo				

Realizado por: Ramos, 2015

Tabla 20-3 Pruebas bioquímicas de los clones puros bacilos y cocos gram positivos aislados de las aguas Termales del Balneario Yanayacu.

	NÚMERO DE CLON	17	26	21	10	27	13
ORIGEN	Petrifilm	Aerobios Totales	<i>E.coli/coliformes</i>	Agar Miuller	Aerobios Totales	<i>E.coli/coliformes</i>	Aerobios Totales
	Punto de muestreo	Fuente	Piscina	Fuente	Piscina	Piscina	Fuente
	Tinción Gram	Coco (+)	Coco (+)	Bacilo (+)	Coco (+)	Coco (+)	Coco (+)
PRUEBAS	Coagulasa	Positivo	Negativo	NA	Positivo	Negativo	Positivo
	Catalasa	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
	Oxidasa	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
	OF	Ferment	Ferment	Oxidativo	Ferment	Ferment	Ferment
	Kligler	NA	Alc/alc	NA	NA	Alc/alc	NA
	Movilidad	NA	Positivo	Positivo	NA	Positivo	NA
	Indol	NA	Negativo	NA	NA	Negativo	NA
	H₂S	NA	Negativo	NA	NA	Negativo	NA
Urea	NA	Negativo	NA	NA	Negativo	NA	
Citrato	NA	Positivo	NA	NA	Positivo	NA	
OTROS	Mac Conkey	NA	Crecimient	NA	NA	Crecimient	NA
	Eosina Azul de Metileno	NA	Crecimient	NA	NA	Crecimient	NA
	A. Bilis-Violeta	NA	Crecimient	NA	NA	Crecimient	NA
	Agar Manitol	Ferment	NA	NA	Ferment	NA	Ferment
	Hidrólisis Gelatina	NA	NA	Negativo	NA	NA	NA
	Hidrólisis Almidón	NA	NA	Positivo	NA	NA	NA
	Crecimiento en NaCl 6,5%	NA	Crecimient (+)	NA	NA	Crecimient (+)	NA
	Agar Sangre	-----	Alfa hemólisis	No aplica	-----	Alfa hemólisis	-----
Género y Especie	<i>S. aureus</i>	<i>E. flavescens</i>	<i>Bacillus spp</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. flavescens</i>	<i>S. aureus</i>	
NA : no aplica		Crecimient (+): crecimiento positivo					

Realizado por: Ramos, 2015

En las tablas 19-3 y 20-3 se muestran los resultados obtenidos de las distintas pruebas realizadas a los clones con el fin de determinar su género y especie.

Mediante las distintas pruebas realizadas se demostró la presencia de los géneros: *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Brevundimonas*, *Shewanella*, *Staphylococcus* y *Bacillus spp*.

Para los clones 9,11 y 15 adicional a las pruebas bioquímicas utilizamos la galería Microgen ID para la identificación ya que el resultado de las pruebas realizadas no fue concluyente para identificar de la especie.

El género *Pseudomonas* tiene la capacidad de colonizar rápidamente e incluso sobrevivir en elevadas concentraciones de sales y temperatura. Se identificaron dos especies *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas stutzeri*. *Pseudomonas aeruginosa* en agar King B se visualizó de un color verdoso alrededor de la colonia. (Martínez, 2007)

Pseudomonas stutzeri es un bacilo gram negativo, móvil ubicuo del suelo y del agua macroscópicamente su colonia presenta un aspecto seco y verrucoso, bordes elevados un hongo de diseminación pequeño que posteriormente puede tomar un aspecto mucoso. (Martínez, 2007)

El género *Staphylococcus* son cocos gram positivos que pueden estar agrupados en forma de cadenas, racimos, tétradas, la mayoría de este género son catalasa positiva lo que permite diferenciar de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus*. La especie identificada fue *Staphylococcus aureus*, la característica fundamental que permitió la identificación de la especie fue la fermentación de manitol.

Enterococcus fue uno de los géneros también presentes en las aguas termales del Balneario Yanayacu.; son cocos gram positivos que crecen a elevadas temperaturas y concentraciones de NaCl (6,5%) catalasa negativo. Una característica relevante es su crecimiento en medios de cultivo como MacConkey y Eosina azul de metileno que son utilizados para el cultivo de bacilos gram negativos. La especie identificada fue *Enterococcus flavescens*, su aislamiento no es común en muestras clínicas.

El género *Aeromonas* son capaces de tolerar temperaturas de hasta 45°C. Son catalasa y oxidasa positivos, de movilidad variable, la especie aislada corresponde *Aeromonas schubertii* su diferencia relevante de las demás especies de este género es la movilidad positiva e indol negativo. (Bravo, 2012)

El género *Brevundimonas* aislado de las aguas termales del Balneario Yanayacu son catalasa variables con temperaturas óptimas de crecimiento que oscila entre 35°C-37°C son microorganismos ambientales presentes en el agua, suelo. (Restrepo et al., 2010)

La especie aislada fue *Brevundimonas diminuta* que se diferencia de la especie *Brevundimonas vesicularis* por el crecimiento positivo en el medio de cultivo MacConkey.

La especie *Shewanella putrefaciens* se aisló en la piscina y el único bacilo gram positivo presente en la fuente fue identificado solo género *Bacillus spp.*

3.9 Especies Identificadas de las Aguas Termales del Balneario Yanayacu.

Tabla 21-3 Especies identificadas de los dos puntos donde emergen las aguas termales del Balneario Yanayacu

ORIGEN	BACTERIAS	
	GÉNERO	ESPECIE
Piscina	<i>Pseudomonas</i>	<i>stutzeri</i>
Piscina	<i>Aeromonas</i>	<i>schubertii</i>
Fuente	<i>Brevundimonas</i>	<i>diminuta</i>
Piscina	<i>Shewanella</i>	<i>putrefaciens</i>
Piscina	<i>Enterococcus</i>	<i>flavescens</i>
Fuente	<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>
Piscina	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>
Fuente		
Fuente	<i>Bacillus</i>	<i>spp</i>

Realizado por: Ramos, 2015

En la tabla 21-3 se muestra las especies identificadas a partir de las aguas termales del Balneario Yanayacu. Encontrándose la especie *Staphylococcus aureus* en los dos puntos; la presencia en la fuente podría deberse a que es una especie que forma parte de la microbiota de piel y mucosas y este sitio tiene un contacto directo con el humano; en el caso de la piscina pudo ser propia del agua termal ya que este punto el contacto con la especie humana y animal se ve dificultado. Su patogenicidad está dada cuando existe una predisposición e inmunodepresión en el huésped, presencia de cuerpos extraños o la ingesta de alimentos contaminados que en sería poco probable ya que el agua es de uso recreativo. (Cervantes et al., 2014)

La especie *Pseudomonas aeruginosa* se encontró en la fuente este punto tiene contacto directo con el ambiente de donde el microorganismo es ubicuo pudo llegar hasta este punto por filtraciones de las aguas procedentes de ríos próximos o de los restos de suelo y gramíneas que habían sido utilizadas por los bañistas para represar el agua. Es poco frecuente que esta especie produzca trastornos en personas sanas, en los bañista pueden generar foliculitis de la bañera u oído del nadador. (Cervantes et al., 2014)

De la piscina se aisló la especie *Pseudomonas stutzeri* que se encuentra ampliamente distribuida en aguas y suelos considerada un contaminante oportunista que en raros casos puede convertirse en un patógeno, es una especie que tienen mayor susceptibilidad a los antimicrobianos. *Enterococcus flavescens* también se aisló de la piscina es una especie que raras veces se comporta como un agente de infección. Presente en el suelo y aguas por su capacidad de resistencia a las altas temperaturas y concentraciones de sales. (Pérez, 2002)

Otro de los géneros aislados de la piscina fue *Aeromonas*; género que si se ha reportado en fuentes de aguas minerales. Las especies de interés clínico son *Aeromonas hydrophila* y *Aeromonas sobria*. La especie aislada en nuestra investigación corresponde *Aeromonas shubertii*. (Mosso et al., 1994).

En la piscina se aislaron las especies *Brevundimonas diminuta*, y *Shewanella putrefaciens* el hábitat natural de estas especies es el suelo y el agua. Como agente patógeno *Shewanella putrefaciens* en los humanos es poco común.

El único bacilo gram positivo aislado de la fuente corresponde al género *Bacillus spp*. Este género se encuentra presente en el suelo y determinadas especies se reportan como como productoras de sustancias con actividad fungicida y bactericida (Ratón et al., 2005)

En el gráfico 6-3 se representa las bacterias identificadas en el balneario Yanayacu que corresponden a: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas stutzeri*, *Brevundimonas diminuta*, *Aeromonas schubertii*, *Shewanella putrefaciens*, *Enterococcus flavescens*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus spp*.

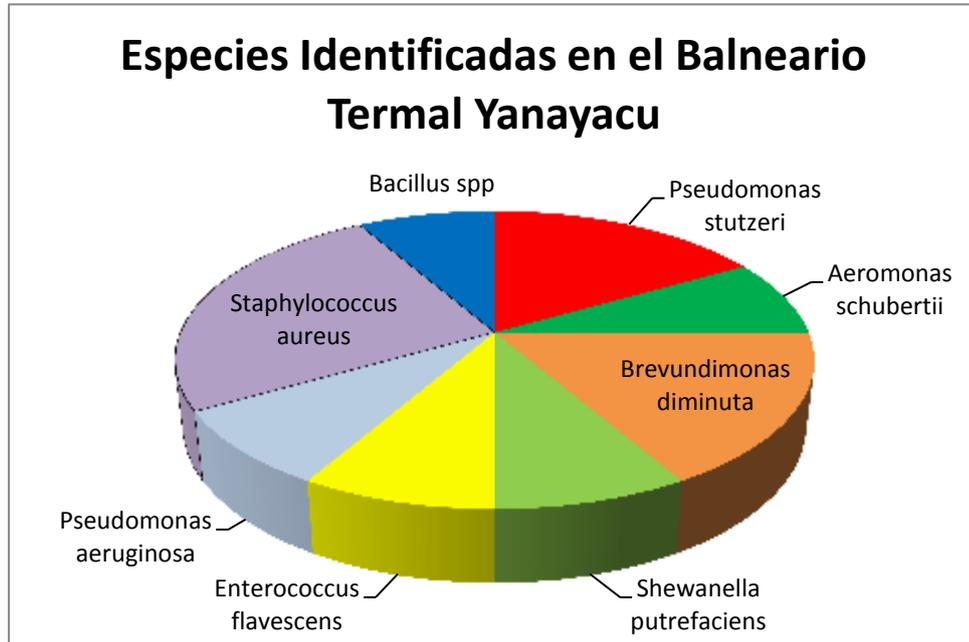


Gráfico 6-3 Especies identificadas de los dos puntos donde emergen las aguas termales del Balneario Yanayacu

Realizado por: Ramos, 2015

Entre las especies identificadas en el balneario termal Yanayacu están: *Staphylococcus aureus*, *Shewanella putrefaciens*, *Enterococcus flavescens*, *Brevundimonas diminuta*, *Aeromonas schubertii*, *Pseudomonas stutzeri*, *Bacillus spp*, *Pseudomona aeruginosa* (gráfico 6-3).

Mosso et al., 2011 realizaron un estudio microbiológico de las aguas termales del Balneario de la Concepción de Villatoya (Albacete) en donde aislaron el género *Pseudomonas* el cual es muy frecuente en manantiales minerales por sus requerimientos nutricionales escasos y diversidad metabólica. El género *Staphylococcus* fue encontrado en baja proporción. Estos géneros también se encontraron en el Balneario Yanayacu por su capacidad de tolerar altas temperaturas, concentraciones de sales y mínimos requerimientos nutricionales como es el caso del género *Pseudomonas*.

De La Rosa et al., 2009 efectuaron un estudio microbiológico de las aguas termales del Balneario de Alicún de las Torres encontrando en el manantial Baños la presencia de bacterias gram negativas no fermentadoras de la especie *Pseudomonas putida* y en el manantial Baños de Abajo bacterias gram negativas no fermentadoras de la especie *Aeromonas Hydrophila* (bacteria autóctona del agua detectada en varios manantiales minerales) .En mayor proporción hallaron en el manantial Baños bacilos gram positivos de los géneros: *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Leifsonia aquatica*, *Rhodococcus*, *Rubrobacter radiotolerans*, Encontraron en menor proporción cocos gram positivos de género *Staphylococcus* y *Kocuria*. Los géneros *Pseudomonas*, *Aeromonas* y *Staphylococcus*, *Bacillus* también fueron encontrados en nuestro trabajo aunque las especies fueron diferentes y según evidencia bibliográfica estas especies no son comunes como causantes de enfermedades en humanos.

De La Rosa et al., 2004 estudiaron la microbiología de las aguas termales del Balneario de Jaraba en donde identificaron especies del género *Pseudomonas*. Entre las bacterias gram negativas no fermentadoras que identificaron destacan: *Burkholderia cepacia*, *Ochrobactrum anthropi*, *Brevundimonas*, *Comamonas*, *Sphingomonas* y *Stenotrophomonas*. Encontraron además cocos gram positivos en muy baja proporción el género identificado fue *Staphylococcus* señalado por investigadores que su presencia en agua naturales y mineromedicinales es frecuente. Los géneros aislados en nuestra investigación que concuerdan con este estudio fueron *Pseudomonas*, *Brevundimonas* y *Staphylococcus*.

3.10 Determinación de la resistencia /sensibilidad a antibióticos de los aislados bacterianos identificados en el presente estudio.

3.10.1 Antibiograma de la especie *Pseudomona aeruginosa* identificada en las aguas termales del Balneario Yanayacu.

Tabla 22-3 Antibiograma obtenido al evaluar el aislado bacteriano identificado como *Pseudomona aeruginosa*

NOMBRE	ANTIBIÓTICOS							
	CRO	NA	SXT	CN	IPM	MH	AMC	MEM
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	S	S	R	S	S	S	R	S
R: Resistente S: Sensible CRO: Ceftriaxona 30 mcg SXT: Trimetoprim/Sulfametoxazol 1.25/23.75 mcg AMC: Amoxicilina/Ácido Clavulánico 20/10 mcg						CN: Gentamicina 10mcg IPM: Imipenem 10 mcg NA :Ácido Nalidixico 30mcg MEM: Imipenem 10 mcg MH: Minociclina		

Realizado por: Ramos, 2015

En la tabla 22-3 se muestra el resultado del antibiograma realizado a la especie *Pseudomonas aeruginosa* aislada de la fuente para lo cual se utilizaron 8 antibióticos, los resultados obtenidos indican que el microorganismo presenta resistencia a dos de ellos: Trimetoprim/Sulfametoxazol y Amoxicilina /Ácido Clavulánico. La amoxicilina pertenece al grupo de beta lactámicos que con la aparición de enzimas que degradan este grupo de fármacos se introdujeron los antibióticos inhibidores de la β - lactamasas (ácido clavulánico) cumpliendo dos papeles importantes: ayudando a recobrar la eficacia de los betalactámicos o ampliando el espectro de acción. (Almaras et al., 1996)

Trimetoprim/Sulfametoxazol se utilizan de forma combinada. El sulfametoxazol pertenece a la familia sulfamida y se combina con trimetoprima para producir efectos sinérgicos. (Carranza et al., 1999).

Según Montero (2012) esta especie presenta resistencia intrínseca o natural a ciertos antibióticos siendo además capaz de adquirir resistencia mediante mutaciones. La resistencia intrínseca viene dada por su membrana externa, probablemente el factor importante sea la presencia de bombas de expulsión con capacidad para expulsar antibióticos betalactámicos, tetraciclina, cloranfenicol, macrólidos, fluoroquinolonas, sulfonamidas y trimetoprim.

La resistencia a estas dos combinaciones de fármacos de esta especie se debe a la presencia de bombas de expulsión en su membrana externa que se clasifican de acuerdo a la fuente de energía, secuencia de aminoácidos y la especificidad del sustrato en esta especie el mayor

número de bombas se incluye dentro de la familia RND (*Resistance-Nodulation-Division*). Se han descrito 10 sistemas RND como bombas de expulsión activa solo la Mex AB-OprM se expresa constitutivamente y su sobreexpresión se asocia a resistencia a los carbapenems, así como a los betalactámicos solos o combinados con inhibidores de las betalactamasas, fluoroquinolonas, tetraciclinas, cloranfenicol, macrólidos, trimetoprim y sulfonamidas. (Montero, 2012)

3.10.2 Antibiograma de los bacilos gram negativos aislados e identificados de las aguas termales del Balneario Yanayacu.

Tabla 23-3Antibiograma Bacilos Gram Negativos

ANTIBIÓTICOS	<i>P.stutzeri</i> (Clon 9)	<i>P.stutzeri</i> (clon11)	<i>A.schubertii</i> (clon12)	<i>B. diminuta</i> (clon14)	<i>S. putrefaciens</i> (clon15)	<i>B. diminuta</i> (clon18)
Gentamicina CN(10mcg)	S	S	S	S	S	S
Cefalotina KF (30mcg)	R	R	R	S	R	S
Ampicilina AM (10mcg)	R	S	S	S	S	-
Amoxicilina+ Ácido Clavulánico	S	S	S	S	S	S
Imipenem IPM (10mcg)	S	S	S	S	S	
Ceftriaxona CRO (30mcg)	S	S	S	S	S	S
Sulfametoxazol+ Trimetoprima STX (1.25/23.75mcg)	R	S	S	S	S	S
Meropenem	-	S	S	S	-	-
R: Resistente	S: Sensible.					

Realizado por: Ramos, 2015

En la tabla 23-3 se indica los resultados obtenidos en el antibiograma realizado a las especies identificadas. Los clones 9 y 11 correspondientes a la especie *Pseudomonas stutzeri* presentaron resistencia a la cefalotina, lo cual concuerda con lo indicado por la Subcomisión de Antimicrobianos (SADEBAC-AMM) quienes mencionan que esta especie es resistente a cefalosporinas de primera generación, adicionalmente el clon 9 fue resistente a ampicilina y sulfametoxazol+ trimetoprima.

Los clones 14 y 18 quienes se identificaron como *Brevundimonas diminuta* presentaron sensibilidad a todos los antibióticos utilizados. En cuanto a su perfil de resistencia, reportado de antibiogramas de aislamientos de *Brevundimonas* de los Centros para Control de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC) muestran susceptibilidad a los aminoglucósidos, con resistencia

importante a ampicilina, así como susceptibilidad variable a penicilinas antipseudomonas y cefalosporinas de tercera generación.(Restrepo et al.,2010)

Tanto la especie *Aeromonas schubertii* (clon 12) como la especie *Shewanella putrefaciens* (clon 15) presentaron resistencia a la cefalotina. En cuanto a la especie *Aeromonas schubertii* hay información limitada en cuanto a antibiogramas ya que no es muy común aislar de muestras clínicas, estudios de susceptibilidad antimicrobiana de cepas aisladas a partir de pacientes con enfermedad diarreica aguda del género demuestran que presenta una alta resistencia a antibióticos como la cefalotina y sulfonamida (Bravo et al., 2010)

La Subcomisión de Antimicrobianos (SADEBAC-AMM) indica que la especie *Shewanella putrefaciens* presenta sensibilidad a múltiples antimicrobianos y recientemente han descrito una betalactamasa cromosómica de clase D (OXA-55) que hidroliza probablemente al imipenem en nuestro caso presentó resistencia a cefalotina.

3.10.3 Antibiograma de los cocos gram positivos aislados e identificados de las aguas termales del Balneario Yanayacu.

Tabla 24-3 Antibiograma de la Especie *Staphylococcus aureus* aislada de las aguas termales del Balneario Yanayacu.

ANTIBIÓTICOS	<i>Staphylococcus aureus</i> (clon 10)	<i>Staphylococcus aureus</i> (clon 13)	<i>Staphylococcus aureus</i> (clon 17)
Gentamicina CN (10mcg)	S	S	S
Penicilina G P(10U)	S	S	S
Clindamicina	S	S	S
Ceftriaxona CRO (30mcg)	S	S	S
Sulfametoxazol+ Trimetoprima STX (1.25/23.75mcg)	S	S	S
Ampicilina AM (10 mcg)	S	S	S
Ácido Nalidixico NA (30 mcg)	S	S	S
Eritromicina E (15mcg)	S	S	S
Vancomicina	S	S	S
Ciprofloxacina CIP (5mcg)	S	S	S
Cefalotina KF (30mcg)	S	S	S
Oxacilina OX(1mcg)	S	S	S
R: Resistente S: Sensible.			

Realizado por: RAMOS, 2015

El primer antibiótico utilizado para el tratamiento de infecciones por *Staphylococcus aureus* fue la penicilina surgiendo después por la frecuente resistencia la meticilina primera penicilina semisintética que tiene la capacidad de evadir la acción de las betalactamasas. Por lo que en la actualidad se utilizan además de la meticilina, otras penicilinas sintéticas (oxacilina y sus derivados fluorados) para el tratamiento de infecciones. Adicionalmente como medicamentos de segunda línea se tiene otros betalactámicos como la cefalosporinas de primera y segunda generación además de lincosamidas, cotrimoxazole y macrólidos. (Zarate et al., 2003)

En la tabla 24-3 se evidencia que los aislados de *Staphylococcus aureus* obtenidos del Balneario Termal Yanayacu mostraron sensibilidad a todos los antibióticos utilizados en este estudio.

3.10.4 Antibiograma de los cocos gram positivos identificados como *Enterococcus flavescens* de las aguas termales del Balneario Yanayacu.

Tabla 25-3Antibiograma de la Especie *Enterococcus flavescens* aislada de las aguas termales del Balneario Yanayacu.

ANTIBIÓTICOS	<i>Enterococcus flavescens</i> (clon26)	<i>Enterococcus flavescens</i> (clon27)
Gentamicina CN (10mcg)	S	S
Penicilina G P(10U)	S	S
Clindamicina DA	R	R
Estreptomina S	S	S
Oxacilina OX (1mcg)	R	R
Ceftriaxona CRO (30mcg)	S	S
Sulfametoxazol+ Trimetoprima STX (1.25/23.75mcg)	S	S
Ampicilina AM (10 mcg)	S	S
Ácido Nalidixico NA (30 mcg)	S	S
Eritromicina E (15mcg)	S	S
Vancomicina	S	S
Ciprofloxacina CIP (5mcg)	S	S
Cefalotina KF (30mcg)	R	R
R: Resistente S: Sensible.		

Realizado por: Ramos, 2015

El género *Enterococcus* presenta una alta resistencia natural a múltiples antimicrobianos: cefalosporinas, oxacilinas, clindamicina, lincomicina, cotrimozaxol, aminoglucósidos además su importancia radica en la capacidad de adquirir resistencia a otros antibióticos entre los que se encuentran: ampicilina-penicilina, cloranfenicol, eritromicina, tetraciclinas, quinolonas, vancomicina-teicoplanina, nitrofurantóina, aminoglucósidos (Juliet, 2002)

En la tabla 25-3 se muestra que las especies *E.flavescens* aisladas del Balneario Termal Yanayacu mostraron resistencia a tres antibióticos: Clindamicina, Oxacilina, Cefalotina.

3.10.5 Antibiograma del género *Bacillus spp* aislado de las aguas termales del Balneario Yanayacu.

Tabla 26-3 Antibiograma del género *Bacillus spp* aislado de las aguas termales del Balneario Yanayacu.

ANTIBIÓTICOS	<i>Bacillus spp.</i>
Gentamicina CN (10mcg)	S
Penicilina G P(10U)	S
Ampicilina AM (10 mcg)	R
Ácido Nalidixico NA (30 mcg)	S
Eritromicina E (15mcg)	S
Ciprofloxacina CIP (5mcg)	S
Cefalotina KF (30mcg)	S
Oxacilina OX(1mcg)	R
Novobiocina NV (30mcg)	S

Realizado por: Ramos, 2015

En la tabla 26-3 se muestran los resultados obtenidos del antibiograma realizado a la especie *Bacillus spp* observándose resistencia a dos antibióticos Ampicilina y Oxacilina. Un estudio realizado in vitro con 35 antibióticos pertenecientes a distintos grupos farmacológicos reveló que *Bacillus spp* presenta mayor sensibilidad a: cloranfenicol, amikacina, doxiciclina, kanamicina, noboviocina, tetraciclina y ampicilina (Gallego et al., 1994)

Esto discrepa de nuestro resultado que muestra que el aislado en cuanto a la ampicilina es resistente.

3.11 Presencia fenotípica de metalo β -lactamasas en clones gram negativos identificados de las Aguas Termales del Balneario Yanayacu.

Tabla 27-3 Presencia fenotípica de metalo β -lactamasas en clones aislados puros gram negativos de las Aguas Termales del Balneario Yanayacu localizado en el cantón la Troncal Provincia de Cañar.

N° CLON	NOMBRE	ANTIBIÓTICOS		
		IMP 10	MEM 10	Disco EDTA (0,5 M)
8	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	S	S	Negativo
9	<i>Pseudomona stutzeri</i>	S	S	Negativo
11	<i>Aeromona shubertii</i>	S	S	Negativo
14	<i>Brevundimona diminuta</i>	S	S	Negativo
15	<i>Shewanella putrefaciens</i>	S	S	Negativo
18	<i>Brevundimona diminuta</i>	S	S	Negativo
R: Resistente:				
S: Sensible				
IPM: Imipenem 10 mcg				
MEM: Meropenem 10 mcg				
EDTA: Ácido Etildiaminotetraacético				

Realizado por: Ramos, 2015

Cuando se observa una deformación en las proximidades del disco de EDTA indica que en la especie aislada hay presencia de algún tipo de metalo β -lactamasas (Navajas, 2013)

En la tabla 27-3 se muestra los resultados obtenidos de la prueba de presencia fenotípica de metalo β -lactamasas. Todas las especies sometidas a esta prueba dieron como resultado negativo.

CONCLUSIONES

Los parámetros determinados *in situ* en el Balneario Termal Yanayacu fueron: temperatura 48°C, temperatura del ambiente 24,5°C, pH 9, conductividad 476,5µS/cm, sólidos totales disueltos 304,5°C ppm.

El recuento de aerobios mesófilos en la piscina fue de $3,28 \times 10^2$ UFC/mL y en la fuente de $9,62 \times 10^2$ UFC/mL. En cuanto al recuento de coliformes en la fuente fue de $7,8 \times 10^1$ UFC/mL de *Escherichia coli* de $1,0 \times 10^0$ UFC/mL y en la piscina el recuento de coliformes fue de $4,5 \times 10^0$ UFC/mL presentando ausencia de *Escherichia coli*. El recuento del género *Staphylococcus* en la fuente fue de $2,74 \times 10^2$ UFC/mL, no hubo presencia de colonias de la especie *Staphylococcus aureus* y el recuento de este género en la piscina fue de 2 UFC/mL la presencia de la especie *Staphylococcus aureus* fue de 1 UFC/mL. En cuanto al recuento de mohos y levaduras solo hubo presencia levaduras en el ojo de agua en contacto con el ambiente que corresponden a 7,5 UFC/mL en la piscina no hubo presencia ni de mohos ni levaduras.

En el balneario termal Yanayacu el porcentaje de bacilos gram negativos fue de 68%, de cocos gram positivos de 20% y bacilos gram positivos de 12%.

Los microorganismos identificados en las Aguas Termales del Balneario Yanayacu del cantón la Troncal provincia de Cañar fueron: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas stutzeri*, *Aeromonas schubertii*, *Brevundimonas diminuta*, *Shewanella putrefaciens*, *Enterococcus flavescens*, *Staphylococcus aureus*.

En cuanto a la susceptibilidad de los antibióticos el clon 9(*Pseudomonas stutzeri*), presentó resistencia a tres antibióticos al igual que los clones 26(*Enterococcus flavescens*) y 27 (*Enterococcus flavescens*), el clon 8 (*Pseudomonas aureginosa*) y *Bacillus spp* presentaron resistencia a dos antibióticos, el clon 12 (*Aeromonas schubertii*) al igual que el clon 15 (*Shewanella putrefaciens*) y el clon 11(*Pseudomonas stutzeri*) presentaron resistencia a un antibiótico. Los clones 10, 13 ,17 identificados como *Staphylococcus aureus* y el clon 14 (*Brevundimonas. diminuta*) presentaron sensibilidad a todos los antibióticos utilizados.

RECOMENDACIONES

Se recomienda al personal que labora en el Balneario sea estricto al momento del ingreso del bañista haciendo cumplir normas básicas (antes del ingreso el bañista deberá ducharse, ir con ropa adecuada, evitar el ingreso de niños con pañales)

Se recomienda que el cambio de las aguas de las piscinas sea diaria con el fin de evitar riesgos en la salud de los bañistas.

Se recomienda realizar controles microbiológicos periódicos en diferentes épocas del año para determinar si la microbiota puede variar con el cambio estacional y si supone un riesgo para la salud se pueda aplicar medidas.

Los microorganismos presentes en las aguas termales del Balneario Yanayacu en su mayoría provocan repercusiones en la salud cuando el sistema inmune se encuentra debilitado, o la exposición de heridas abiertas por lo que se recomienda que si el bañista se encuentra en esas condiciones no ingrese a las piscinas del Balneario.

Por medio de la autoridad pertinente del Ecuador que se realice una normativa, en la que esté estipulada la calidad sanitaria que deben tener los balnearios utilizados tanto con fines terapéuticos como recreativos.

BIBLOGRAFÍA

ACOSTA, Silvia. *Enterococcus* [en línea]. Buenos Aire: 2014. [Consulta 2015-05-22]. Disponible en: <http://www.codeinep.org/control/Enterococcus.pdf>.

ALVARENGA, Emilio; &ARAGON, Enrique. *Determinación de la calidad microbiológica del Agua de las piscinas ubicadas en el complejo deportivo de ciudad Merliot y el Polideportivo de la Universidad de el Salvador durante tres meses del año 2011* [en línea]. El Salvador: 2011. [Consulta: 2015-06-02]. Disponible en:
http://ri.ues.edu.sv/2090/1/Determinaci%C3%B3n_de_la_calidad_microbiol%C3%B3gica_del_agua_de_piscinas_ubicadas_en_el_Complejo_Deportivo_de_Ciudad_Merliot_y_el_Polideportivo_de_la_Universidad_de_El_Salvador_durante_tres_meses_del_a%C3%B1o_2011.pdf

ALMARAZ, Giner; et al. “Valoración de los inhibidores de las Betalactamasas”. *Farmacia Hospitalaria*, vol20, n°4(1996), (España) pp.225-235.

ARANZA, José; et al. *Quinolonas. Sulfamidas. Trimetoprima. Cotrimoxazol. Nitrofurantoína* [en línea]. España: 1999. [Consulta 2015-06-08]. Disponible en:
http://www.hvil.sld.cu/bvs/archivos/659_68quinolonas.%20sulfamidas.%20trimetoprima..pdf

BAILÓN, Lucia; et al. *Atlas de Pruebas Bioquímicas para identificar bacterias* [en línea]. México, 2003. [Consulta2015-05-22]. Disponible en:
<https://microbitos.files.wordpress.com/2010/06/atlasmicrobiologia1.pdf>.205-04-28.

BOU, Germán; et al. “Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de Microbiología”. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Vol 29, n°8 (2011), (España) pp. 602-604.

BRAVO, Laura; et al. “Aeromonas spp asociada a enfermedad diarreica aguda en Cuba: estudio de casos y controles”. *SCIELO*, vol 29, n°1 (2012), (Cuba) pp.44-48.

CAVALIERE, Stephen; et al. *Manual de Susceptibilidad Antimicrobiana* [en línea].Washington:2005. [Consulta: 2015-05-30].

Disponible en:

http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=22691&Itemid

CERCENADO, Emilia; & SAAVENDRA-LOZANO, Jesús *Interpretación del antibiograma conceptos generales*. Madrid: 2011. [Consulta: 2015-05-30]. Disponible en: http://apps.elsevier.es/watermark/ctl_servlet?_f=10&pident_articulo=80000504&pident_usuario=0&pcontactid=&pident_revista=51&ty=35&accion=L&origen=apcontinuada&web=www.apcontinuada.com&lan=es&fichero=v7n4a404pdf001.pdf

CHANS, Gerardo. *Estafilococos* [en línea].Barcelona: 2002. [Consulta 2015-05-22].Disponible en: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap%2017.pdf>.

DELGADO, Martín; et al. “Análisis Microbiológico y Fisicoquímico del agua de Piscinas de la isla de Tenerife”. *Revista Sanidad e Higiene Pública*, vol 66 (1992), (España), pp. 281-289.

DE LA ROSA, M^a Carmen; et al. “Microbiología de las aguas mineromedicinales de los Balnearios de Jaraba”. *Anales de la Real academia de farmacia*, vol 70(2004), (España), pp 521-542.

DE LA ROSA, M^a Carmen; et al. “Microbiología del agua mineromedicinal del Balneario El Paraíso de Manzanera (Teruel)”. *Anales de la Real academia de farmacia*, vol 67 (2001), (España), pp.1-12.

DE LA ROSA, M^a Carmen; et al. “Microbiología del manantial mineromedicinal del Balneario de Puente Viesgo”. *Anales de la Real academia de farmacia*, vol 73(2007), (España) pp.251-265.

DE LA ROSA, M^a Carmen; et al. “Microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario Alicún de las Torres”. *Anales de la Real academia de farmacia*, vol 75 (2009), (España), pp.763-780.

DE LA ROSA, M^a Carmen; et al. “Microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario Alicún de las Torres”. *Anales de la Real academia de farmacia*, vol 75 (2009), (España) pp. 763-780.

DE LA ROSA, M^a Carmen; et al. “Análisis microbiológico de las aguas”. *Anales de la Real academia de farmacia*, vol 11(2013), (España) pp.68-81.

DÍAZ, Marylin; et al. “Aspectos Fundamentales sobre el género *Enterococcus* como patógeno de elevada importancia en la actualidad”. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, vol 48, n°2(2010), (Cuba) pp 147-161.

FAGUNDO, Juan; & GONZÁLEZ, Patricia. *Aguas Naturales, Minerales, Mineromedicinales* [en línea]. España, 1996. [Consulta 2015-04-14]. Disponible en: <http://www.sld.cu/sitios/mednat/docs/aguas.pdf>.

FORBES, B; et al. *Bailet & Sscott Diagnóstico Microbiológico* [en línea].12^a ed. Buenos Aires-Argentina: Médica Panamericana, 2009, pp. 343-344. [Consulta 2015-05-02]. Disponible en: <https://books.google.es/books?id=239cauKqSt0C&pg=PA343&dq=pseudomonas+stutzeri+importancia+clinica&hl=es&sa=X&ei=7gBsVfbANsjsgwTVpIKgCg&ved=0CDUQ6AEwBA#v=onepage&q=pseudomonas%20stutzeri%20importancia%20clinica&f=false>.

Gobierno Municipal Autónomo del Cantón La Troncal Unidad de Turismo. *Balneario Yanayacu* [en línea]. Ecuador, 2006, pp. 1-4. [Consulta 2015-04-15]. Disponible en: <http://www.elaguapotable.com/CONTROL%20DE%20CALIDAD%20DE%20LAS%20AGUAS%20MINERO-MEDICINALES.pdf>

GARCÍA, María; et al. *Manual Auxiliar de Laboratorio* 2^a ed. Madrid – España: MAD S.L, 2003, pp. 598-599.

GARCÍA, V. *Introducción a la Microbiología.* 2^a ed. Costa Rica: EUNED, 2004, pp. 41-42.

GONZÁLEZ, María; et al. “*Aeromonas* spp: patógenos emergentes a considerar en aguas”: *Revista de Agencia de Medio Ambiente*, n°6(2004), (Cuba) pp.1-12.

HERNÁNDEZ, Alicia; et al. *Microbiología Industrial* .1^a ed. Costa Rica: Universidad Estatal a Distancia, 2003, pp.208.

INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA DE CHILE. *Vigilancia de *Enterococcus* spp resistentes a la Vancomicina* [en línea]. Cuba: 2012. [Consulta 2015-05-26]. Disponible en: <http://www.ispch.cl/sites/default/files/Enterococo%2023-09-2013.pdf>.

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGÍA E HIDROLOGÍA. *Termalismo en Ecuador* [en línea]. Quito: 2013. [Consulta: 2015-06-01]. Disponible en: <http://issuu.com/inamhi/docs/termalismo>

JULIET, Chrystal. “Estudio de susceptibilidad in vitro de *Enterococcus spp*”. *Revista Chilena de Infectología*, vol 19, n°2(2002), (Chile) pp.111-115.

KONEMAN, Elmer; et al. *Diagnóstico Microbiológico*. 6ª ed. Buenos Aires-Argentina: Médica Panamericana, 2008, pp. 210,301-308.

LALUCAT, Jorge; et al. “Biology of *Pseudomona stutzeri*”. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. Vol 70, n°2(2006), (España) pp.511-514.

LÓPEZ, Patricia; et al. “El Turismo de Salud y Uso Terapéutico del Agua. *Estudio y Perspectivas en Turismo*. Vol 20(2011), (Brasil) pp. 462-477.

MACURALLA, José. *Bioquímica Humana* [en línea]. 2ª ed. Barcelona-España: REVERTÉ S.A, 1994, pp.161-162.

MACFADDIN, Jean. *Pruebas Bioquímicas para la identificación de Bacterias de Importancia Clínica*. [en línea]. 3ª ed. Madrid-España: Médica Panamericana S.A, 2003, pp 74-75,346-347,354-355.

MARAVÉ, Francisco. *Vademécum de las Aguas Mineromedicinales* [en línea]. España: 2008 [Consulta: 2014-04-17]. Disponible en:
http://pendientedemigracion.ucm.es/info/hidromed/fileadmin/user_upload/descargas/Vademecum-espanol.pdf.

MARTÍNEZ, Lidia. *Pseudomona aeruginosa Aportación al conocimiento de la estructura y al de los mecanismos que contribuyen a su resistencia a los antimicrobianos* [en línea]. España: 2007. [Consulta 2015-05-07]. Disponible en:
http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/2521/LRM_TESIS.pdf?sequence=1.

MELGOSA, Francisco. *Turismo de salud: Termalismo y Balnearios* [en línea]. España-Salamanca: 2000. [Consulta: 2014-04-14]. Disponible en:
http://gredos.usal.es/jspui/bitstream/10366/122090/1/DDAFP_MelgosaArcos_Turismodesaludtermalismiobalnearios.

MICROGEN BIOPRODUCTS LTD. *Instrucciones de Uso Microgen TM GN-ID Identificación* [en línea]. España: 2004. [Consulta 2015-05-06]. Disponible en:
<http://www.medica-tec.com/chi/files/MICROGEN-GN-ID-MID64-641-65..pdf>.

MONTERO, María. *Pseudomonas aureginosa multiresistente: aspectos epidemiológicos, clínicos y terapéuticos* [en línea].Barcelona:2012. [Consulta: 2015-06-04].Disponible en: <http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/107902/mmm1de1.pdf?sequence=1>

MONTOYA, Hugo. *Microbiología Básica para el Área de la Salud y Afines* [en línea].2ª ed. Antioquia-Colombia: Universidad de Antioquia, 2008, pp. 22-23.[Consulta 2015-04-25]. <https://books.google.com.ec>.

MOSSO, Mª Ángeles; & DE LA ROSA, Mª Carmen. “Microbiología de los Manantiales mineromedicinales del Balneario del Baños del Concepción”. *Anales de la Real academia de farmacia*, vol 77(2011), (España) pp.58-71.

MOSSO, Mª Ángeles; et al. “Microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario de Valdelateja”. *Anales de la Real academia de farmacia*, vol29 (2008), (España) pp.505-519.

MOSSO, Mª Ángeles; & DE LA ROSA, Mª Carmen. “Microbiología del Agua Mineromedicinal de los Balnearios de Alhama de Granada”. *Anales de la Real academia de farmacia*, vol 68 (2002), (España) pp. 68-72.

MOSSO, Mª Ángeles; et al. “Microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario de Cervantes”. *Anales de la Real academia de farmacia*, vol 72(2006), (España) pp285-304.

MUÑOZ, Luis; et al. “Seudoquiste pancreático infectado por *Shewanella putrefaciens*: reporte caso”.*ELSEVIER Infect*, n°30(2014), (Colombia) pp.1-4.

NAVAJAS, Enrique. *Diseminación, área de Enterobacterias en el entorno de una granja bovina y estudio de los fenotipos y genotipos de resistencia a antibióticos.* (Tesis de grado).Grado en Química, Universidad de Rioja. Facultad de Ciencias. Escuela de Agroalimentarios e Informática. España, 2013, pp.27

NEGRONI, Marta. *Microbiología Estomatológica Fundamentos y Guía de prácticas.*2ª ed. Buenos Aires-Argentina: Médica Panamericana S.A, 2009, pp: 48-49,358

PAHISSA, Albert. *Infecciones producidas por Staphylococcus aureus.* 1ª ed. Barcelona-España: ICG Marge SL, 2009, pp. 20-21.

PASCUAL, M. ^a del Rosario; et al. *Microbiología Alimentaria* .2^a ed. Madrid-España: Díaz de Santos S.A, 2000, pp.17-18, 142-143.

PEÑA, Boris. *Caracterización de Sistemas Hidrominerales en el Distrito Físico Geográfico Pinar del Río* [en línea]. Cuba, 2000. [Consulta 2015-04-17]. Disponible en: <http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/rehabilitacion-bal/tesisboris.pdf>.

PINUAGA, Juan. *Infraestructura Hidrotermal* [en línea]. España, 2000. [Consulta: 2014-04-17]. Disponible en: http://aguas.igme.es/igme/publica/pdfjor_aguas_mine/3_infraestructura.pdf.

RATÓN, Tania; et al. “Aislamiento del genero *Bacillus* spp con potencialidades para la bioprotección y la estimulación del crecimiento vegetal”: *Revista Cubana de Química*, vol17, n°1(2005), (Cuba), pp.189-195.

RESTREPO, Mauricio; el al. “Artritis reactiva asociada a bacteriemia por *Brevundimona diminuta*”. *Revista Colombiana de Reumatología*, vol 17, n°4(2010), (Colombia) pp.245-248.

RODÉS, Benito. *Control de calidad de las Aguas- Mineromedicinales* [en línea]. España, 2002. [Consulta: 2014-04-22]. Disponible en: <http://www.elaguapotable.com/CONTROL%20DE%20CALIDAD%20DE%20LAS%20AGUAS%20MINERO-MEDICINALES.pdf>.

RODRIGUEZ, Evelin.; et al. *Bacteriología General Principios y Prácticas de laboratorio*.1^a ed. Costa Rica: Universidad de Costa Rica, 2005, pp.141-142.

ROMERO, Raúl. *Microbiología y Parasitología Humana*. 3^a ed. México: Médica PanamericanaS.A, 2007, pp. 625-628.

SUBCOMISIÓN DE ANTIMICROBIANOS. *Consenso sobre criterio de ensayo, interpretación e informe de las pruebas de sensibilidad en los BNNF de importancia clínica*. Buenos Aires: 2005. [Consulta: 2015-06-12].
Disponible en: http://aam.org.ar/src/img_up/30072014.3.pdf

Subprograma de Control Sanitario del Agua. *Control Sanitario del agua* [en línea]. Cuba, 2012. [Consulta: 2014-11-30]. Disponible en: <http://files.sld.cu/sida/files/2012/01/prog-cont-sanit-agua.pdf>.

TOTORA, Gerad; et al. *Introducción a la Microbiología*. 9^a ed. Buenos Aires- Argentina: Médica Panamericana S.A, 2007, pp: 86-168-172.

VIGNIER, Nicolás; et al. “Human Infection with *Shewanella putrefaciens* and *S. algae*: Report of 16 Cases in Martinique and Review of the Literature”. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol 89, n°1 (2013), (United State of América) pp.151-156.

YEPES, Adriana. “Calidad microbiológica y fisico-química del agua para usos recreativos en las playas de Bocagrande y Marbella, en Cartagena de Indias, Colombia”. *Revista Científica*, vol 8 (2006), (Colombia) pp.65-84.

ZARATE, Juan; & IGLESIA, David. “Estafilococo Meticilino resistente, un problema actual en la emergencia de resistencia entre gram positivos”. *Revista Médica Herediana*, vol 14, n°4(2003), (Perú) pp. 1-12.

ZHANG, Fan; et al. “Genomovar assignment of *Pseudomonas stutzeri* populations inhabiting produced oil reservoirs”, *Microbiology Open*, vol3, (2014), (China) pp. 446-455.

3M. *Petriefilm. Guía de interpretación* [en línea]. España, 2009. [Consulta 2015-04-28]. Disponible en: http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat.workshopmrama/files/Petriefilm_guias.pdf.

ANEXOS

ANEXO A: Balneario Termal Yanayacu.



Fotografía 1 Balneario Termal Yanayacu
Fuente: Ramos, Y. 2015.



Fotografía 2 Piscinas del Balneario
Fuente: Ramos, Y. 2015.

ANEXO B: Puntos de muestreo realizados en el Balneario



Fotografía 3 Punto de muestreo fuente
Fuente: Ramos, Y. 2015.



Fotografía 4 Punto de muestreo interior de la piscina.
Fuente: Ramos, Y. 2015.

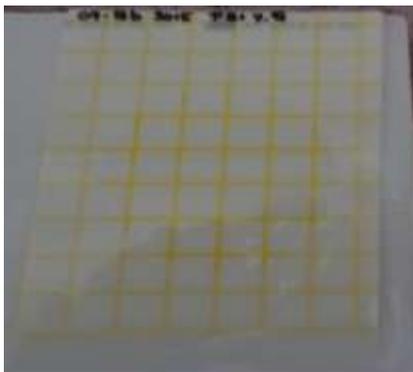
ANEXO C: Determinación de parámetros *in situ*.



Fotografía 5 Determinación de parámetros físicos.

Fuente: Ramos, Y. 2015.

ANEXO D: Siembra en Petrifilm de las muestras tomadas en los dos puntos de donde emergen las aguas termales del Balneario Yanayacu..



Fotografía 6 Petrifilm para recuento de aerobios mesófilos.

Fuente: Ramos, Y. 2015.



Fotografía 7 Petrifilm para recuento de *E.coli*/coliformes.

Fuente: Ramos, Y. 2015.



Fotografía 8 Petrifilm recuento del género *Staphylococcus*.

Fuente: Ramos, Y. 2015.



Fotografía 9 Petrifilm recuento de mohos y levaduras.

Fuente: Ramos, Y. 2015.



Fotografía 10 Método de siembra en Petrifilm.
Fuente: Ramos, Y. 2015.

ANEXO E: Resultados del recuento de las bacterias obtenidas a partir de las muestras tomadas en dos puntos donde emergen las aguas termales del Balneario Yanayacu.



Fotografía 11 Recuento de aerobios mesófilos (fuente).
Fuente: Ramos, Y. 2015.



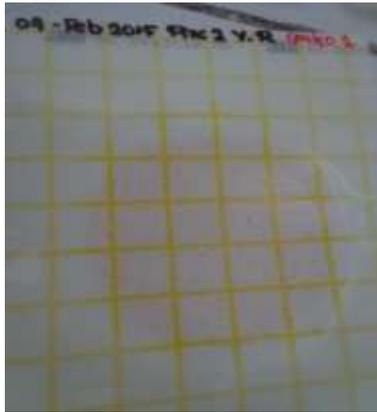
Fotografía 12 Recuento de coliformes (fuente).
Fuente: Ramos, Y. 2015.



Fotografía 13: Recuento del género *Staphylococcus*. (fuente)
Fuente: Ramos, Y. 2015.



Fotografía 14: Recuento de mohos y levaduras. (fuente)
Fuente: Ramos, Y. 2015



Fotografía 15 Recuento de aerobios mesófilos (piscina)
Fuente: Ramos, Y. 2015.



Fotografía 16 Recuento de *E.coli*/coliformes (piscina)
Fuente: Ramos, Y. 2015.

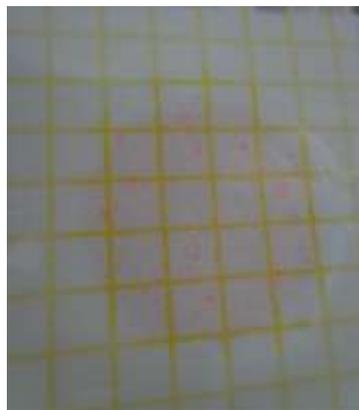


Fotografía 17 Recuento del género *Staphylococcus*. (piscina)
Fuente: Ramos, Y. 2015.



Fotografía 18 Recuento de mohos y levaduras.(piscina)
Fuente: Ramos, Y. 2015

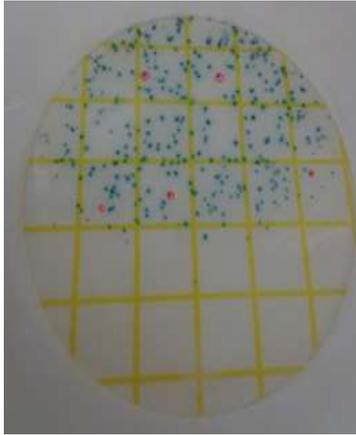
ANEXO F: Clones seleccionados para la realización de repiques.



Fotografía 19: Colonias seleccionadas de petrifilm de aerobios (piscina).
Fuente: Ramos, Y. 2015.



Fotografía 20: Colonias seleccionadas del petrifilm *E.coli*/coliformes (fuente).
Fuente: Ramos, Y. 2015.



Fotografía 21 Colonias seleccionadas del petrifilm de *Staphylococcus* (manantial).
Fuente: Ramos, Y. 2015.

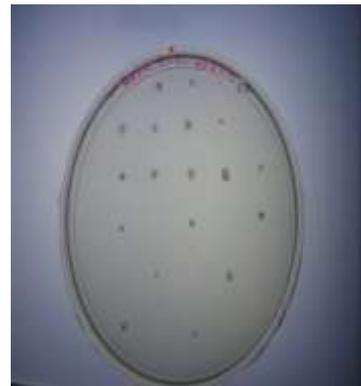


Fotografía 22 Colonias seleccionadas del agar Miuller (piscina).
Fuente: Ramos, Y. 2015

ANEXO G: Repique de los clones seleccionados



Fotografía 23 Primer Repique (agar Miuller)
Fuente: Ramos, Y. 2015.



Fotografía 24 Primer repique (Petrifilm)
Fuente: Ramos, Y. 2015.



Fotografía 25 Primer repique aisladas (Petrifilm)
Fuente: Ramos, Y. 2015.



Fotografía 26: Segundo repique (Petrifilm)
Fuente: Ramos, Y. 2015



Fotografía 27 Segundo Repique
(agar Mueller)
Fuente: Ramos, Y. 2015.



Fotografía 28 Segundo repique
aisladas (Petrifilm)
Fuente: Ramos, Y. 2015.



Fotografía 29 Tercer repique.
(petrifilm)
Fuente: Ramos, Y. 2015.



Fotografía 30 Tercer repique
(agar Mueller)
Fuente: Ramos, Y. 2015

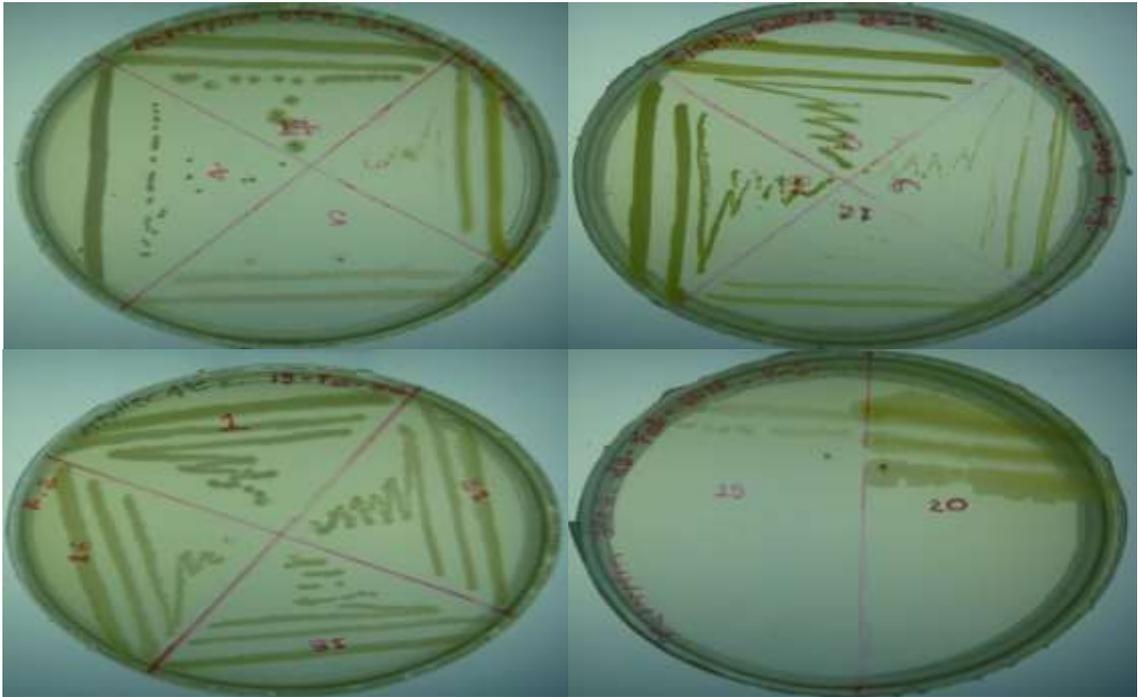


Fotografía 31 Cuarto repique.
(petrifilm)
Fuente: Ramos, Y. 2015.



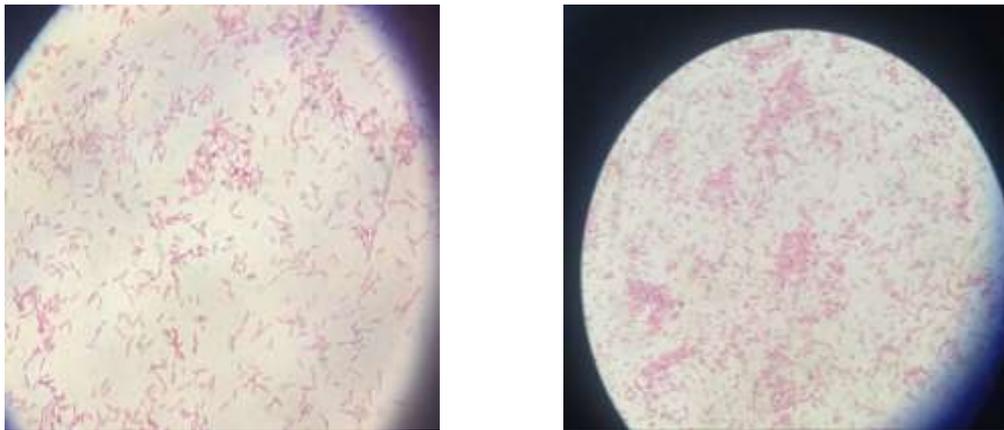
Fotografía 32 Cuarto repique.
(agar Mueller)
Fuente: Ramos, Y. 2015.

ANEXO H: Estrías de las clones aislados.

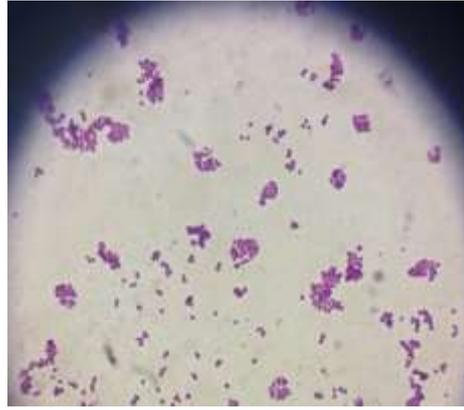
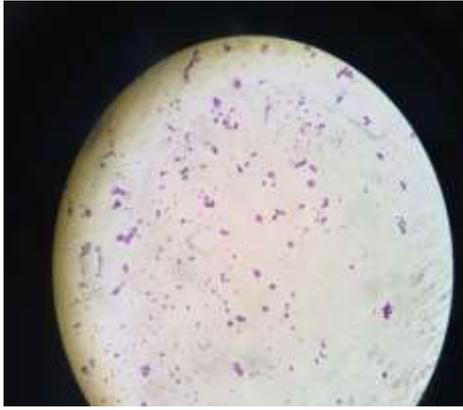


Fotografía 33 Estrías de clones aislados.
Fuente: Ramos, Y. 2015.

ANEXO I: Tinción Gram de los clones puros.



Fotografía 34 Bacilos gram negativos
Fuente: Ramos, Y. 2015.

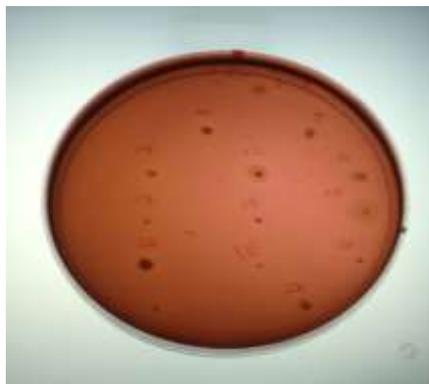


Fotografía 35 Cocos gram positivos.
Fuente: Ramos, Y. 2015.



Fotografía 36 Bacilos Gram positivos.
Fuente: Ramos, Y. 2015.

ANEXO J: Morfología macroscópica de los clones puros.

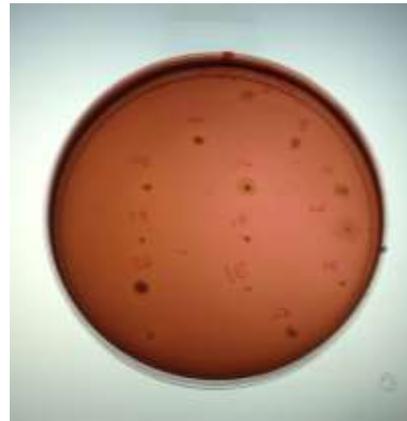


Fotografía 37: Clones puros.
Fuente: Ramos, Y. 2015.

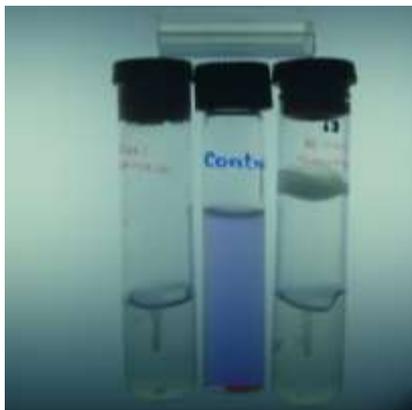
ANEXO K: Pruebas de identificación de bacilos gram negativos.



Fotografía 38 Crecimiento en agar bilis.
Fuente: Ramos, Y. 2015.



Fotografía 39 Crecimiento en agar MacConkey.
Fuente: Ramos, Y. 2015.



Fotografía 40 Medio OF
Fuente: Ramos, Y. 2015.



Fotografía 41 Prueba de la oxidasa
Fuente: Ramos, Y. 2015



Fotografía 42 Resultados Pruebas bioquímicas.
Fuente: Ramos, Y. 2015.

ANEXO L: Pruebas de identificación de bacilos gram negativos. Sistema Comercial Microgen™

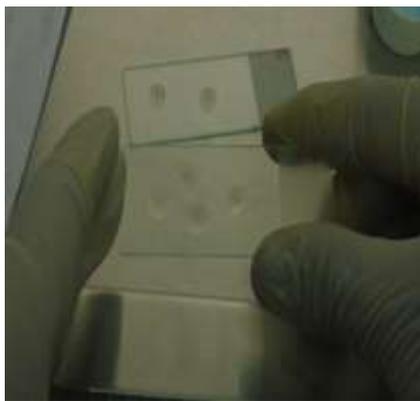


Fotografía 43 Tira GNA
Fuente: Ramos, Y. 2015.



Fotografía 44 Tira GNB
Fuente: Ramos, Y. 2015.

ANEXO M: Pruebas de identificación de cocos y bacilos gram positivos.



Fotografía 45 Prueba de la catalasa.
Fuente: Ramos, Y. 2015.



Fotografía 46 Prueba oxidasa
Fuente: Ramos, Y. 2015.



Fotografía 47 Crecimiento en agar bilis.
Fuente: Ramos, Y. 2015.



Fotografía 48 Fermentación de manitol
Fuente: Ramos, Y. 2015.



Fotografía 49 Agar Sangre β Hemólisis.
Fuente: Ramos, Y. 2015.



Fotografía 50 Agar Almidón prueba positiva.
Fuente: Ramos, Y. 2015.

ANEXO N: Antibiograma de las especies identificadas en el Balneario Termal Yanayacu.



Fotografía 51 Antibiograma de *Pseudomonas aureginosa*.
Fuente: Ramos, Y. 2015.



Fotografía 52 Antibiograma de *Pseudomonas stutzeri*.
Fuente: Ramos, Y. 2015.



Fotografía 53 Antibiograma de *Aeromonas shubertii*.
Fuente: Ramos, Y. 2015.



Fotografía 54 Antibiograma de *Brevundimonas diminuta*.
Fuente: Ramos, Y. 2015.



Fotografía 55 Antibiograma de *Shewanella putrefaciens*.
Fuente: Ramos, Y. 2015.



Fotografía 56 Antibiograma de *Staphylococcus aureus*.
Fuente: Ramos, Y. 2015.



Fotografía 57 Antibiograma de *Enterococcus flavescens*.
Fuente: Ramos, Y. 2015.



Fotografía 58 Antibiograma de *Bacillus spp.*
Fuente: Ramos, Y. 2015.

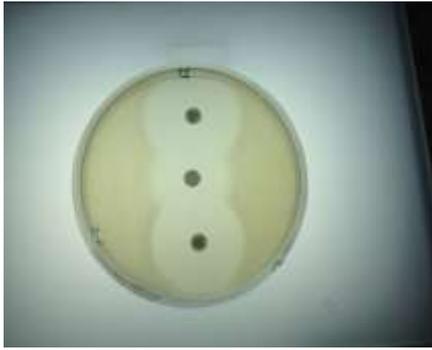
ANEXO O: Antibiograma con EDTA de las especies identificadas en el Balneario Termal Yanayacu.



Fotografía 59 Fenotipos de resistencia de *Pseudomonas aeruginosa*.
Fuente: Ramos, Y. 2015.



Fotografía 60 Fenotipos de resistencia de *Pseudomonas stutzeri*.
Fuente: Ramos, Y. 2015.



Fotografía 61 Fenotipos de resistencia de *Pseudomona stutzeri*.

Fuente: Ramos, Y. 2015.



Fotografía 62 Fenotipos de resistencia de *Aeromona shubertii*.

Fuente: Ramos, Y. 2015.



Fotografía 63 Fenotipos de resistencia de *Brevundimonas diminuta*.

Fuente: Ramos, Y. 2015.



Fotografía 64: Fenotipos de resistencia de *Shewanella putrefaciens*.

Fuente: Ramos, Y. 2015.