



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**ESTUDIO MICROBIOLÓGICO DE LAS AGUAS TERMALES DEL
BALNEARIO EL CACHACO UBICADO EN LA PARROQUIA
CALACALÍ DE LA PROVINCIA DE PICHINCHA**

Trabajo de titulación presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

AUTORA: SANDRA ELIZABETH CORTES BONILLA

TUTOR: DR. GERARDO EMILIO MEDINA RAMÍREZ

Riobamba - Ecuador

2016

DERECHOS DE AUTOR

©2016, Sandra Elizabeth Cortes Bonilla

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

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 EL CACHACO UBICADO EN LA PARROQUIA CALACALÍ DE LA PROVINCIA DE PICHINCHA**", de responsabilidad de la señorita Sandra Elizabeth Cortes Bonilla, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal de Trabajo de Titulación, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Dr. Gerardo Medina

DIRECTOR DEL TRABAJO

DE TITULACIÓN

Dr. Carlos Espinoza

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Dra. María Eugenia Macas

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

DOCUMENTALISTA

SISBIB ESPOCH

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Yo, Sandra Elizabeth Cortes Bonilla 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.

Sandra Elizabeth Cortes Bonilla

DEDICATORIA

Quiero dedicar el presente Trabajo de Titulación a Dios por darme la vida y permitirme seguir adelante con cada una de mis metas y propósitos.

A mis padres Leonor y Marcelo por ser mi inspiración, el motor de mi vida, por brindarme su apoyo incondicional de manera económica y moral hasta en los momentos más difíciles de mi vida siendo mi soporte para no desfallecer.

A mi familia en especial a mis abuelitos María Luisa, Eloy, Segundo, Dolores a quienes ya no tengo a mi lado y finalmente a mis maestros quienes me guiaron en el camino del saber y del conocimiento durante toda mi vida académica en esta prestigiosa institución.

Sandra

AGRADECIMIENTO

Mi más sincero agradecimiento a Dios por darme sabiduría y salud, a mis padres por darme la educación, ser mi apoyo, mi ejemplo y mis ganas de seguir adelante.

A mi familia en especial a mis abuelitos quienes desde el cielo me iluminan en cada paso que doy y aunque no los pueda ver sé que están a mi lado en todo momento, pues son mis cuatro ángeles.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia que considero como si segundo hogar, en donde he vivido triunfos y derrotas, todo como un aprendizaje de la vida.

A mis maestros quienes supieron compartir conmigo sus conocimientos y me ayudaron a formarme para ser ahora una excelente profesional.

Al Dr. Gerardo Medina por el asesoramiento, apoyo, ayuda incondicional brindada y por siempre estar pendiente de la realización de este trabajo de investigación.

Al Dr. Carlos Espinoza por su colaboración y gran aporte en el presente trabajo, quien a más de ser un excelente docente es un excelente amigo.

Al señor Edgar Iván Quishpe administrador del balneario El Cachaco, quien tuvo toda la predisposición de brindarme su ayuda para realizar el presente Trabajo de Titulación.

Sandra

TABLA DE CONTENIDO

CONTENIDO	Páginas
PORTADA.....	i
DERECHO DE AUTOR.....	ii
CERTIFICACIÓN.....	iii
DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD.....	iv
DEDICATORIA.....	v
AGRADECIMIENTO.....	vi
TABLA DE CONTENIDO.....	vii
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	xv
ÍNDICE DE TABLAS.....	xvi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xix
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	xxii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xxiii
RESUMEN.....	xxiv
ABSTRACT.....	xxv
INTRODUCCIÓN.....	1

CAPÍTULO I

1.	MARCO TEORICO O REFERENCIAL.....	8
1.1	Agua.....	8
1.1.1	<i>Propiedades físicas del agua.....</i>	<i>9</i>
1.1.2	<i>Propiedades químicas del agua.....</i>	<i>10</i>
1.1.3	<i>Propiedades biológicas.....</i>	<i>11</i>
1.2	Agua subterránea natural.....	11
1.2.1	<i>Propiedades fisicoquímicas de las aguas subterráneas naturales.....</i>	<i>11</i>
1.2.2	<i>Aguas minerales y mineromedicinales.....</i>	<i>12</i>
1.3	Aguas termales.....	12
1.3.1	<i>Origen de las aguas termales.....</i>	<i>13</i>
1.3.2	<i>Clasificación de las aguas termales.....</i>	<i>14</i>
1.3.3	<i>Propiedades curativas de las aguas termales.....</i>	<i>16</i>
1.3.3.1	<i>Enfermedades que pueden tratarse con las aguas termales.....</i>	<i>17</i>
1.4	Parroquia Calacalí.....	18
1.4.1	<i>Balneario El Cachaco.....</i>	<i>19</i>
1.4.1.1	<i>Localización del Balneario El Cachaco.....</i>	<i>20</i>
1.4.1.2	<i>Aguas termales del Balneario El Cachaco.....</i>	<i>20</i>
1.5	Contaminación del agua.....	22
1.5.1	<i>Principales contaminantes del agua.....</i>	<i>23</i>
1.5.2	<i>Control de calidad de las aguas termales.....</i>	<i>24</i>

1.5.2.1	<i>Indicadores microbiológicos de la calidad del agua</i>	25
1.5.3	<i>Legislación</i>	29
1.6	Microbiología	31
1.6.1	<i>Microorganismo</i>	31
1.6.1.1	<i>Bacterias</i>	31
1.6.1.1.1	<i>Morfología bacteriana</i>	32
1.6.2	<i>Microbiología del agua</i>	33
1.6.3	<i>Microbiota de las aguas termales</i>	33
1.6.3.1	<i>Microorganismos autóctonos</i>	34
1.6.3.2	<i>Microorganismos alóctonos</i>	36
1.7	Medios de cultivo	37
1.7.1	<i>Clasificación de los medios de cultivo</i>	38
1.7.2	<i>Placas 3M Petrifilms</i>	47
1.8	Cultivo de microorganismos	48
1.8.1	<i>Requisitos de crecimiento microbiano</i>	49
1.8.2	<i>Siembra de microorganismos</i>	50
1.8.3	<i>Recuento de microorganismos</i>	50
1.8.3.1	<i>Métodos de conteo del crecimiento microbiano</i>	51
1.8.4	<i>Características macroscópicas de las colonias</i>	52
1.8.5	<i>Aislamiento de microorganismos</i>	54
1.8.5.1	<i>Cultivo puro</i>	55
1.9	Identificación bacteriana	55
1.9.1	<i>Técnicas para la identificación bacteriana</i>	56
1.9.2	<i>Tinción Gram</i>	57
1.10	Pruebas bioquímicas	59

1.10.1	<i>Prueba de la Catalasa</i>	60
1.10.2	<i>Prueba de la Oxidasa</i>	60
1.10.3	<i>Óxido-Fermentación</i>	61
1.10.4	<i>Prueba del agar hierro de Kligler</i>	61
1.10.5	<i>Prueba del agar Simmons Citrato</i>	61
1.10.6	<i>Prueba de la Ureasa</i>	62
1.10.7	<i>SIM</i>	62
1.10.7.1	<i>Indol</i>	63
1.10.8	<i>Prueba de la Coagulasa</i>	63
1.10.9	<i>Crecimiento en caldo hipersalino</i>	64
1.10.10	<i>Hidrólisis de la gelatina</i>	64
1.10.11	<i>Hidrólisis del almidón</i>	64
1.11	<i>Antimicrobiano</i>	65
1.11.1	<i>Antibiótico</i>	65
1.11.1.1	<i>Clasificación de los antibióticos</i>	65
1.11.2	<i>Resistencia antimicrobiana</i>	68
1.11.2.1	<i>Causas de la resistencia antimicrobiana</i>	69
1.11.2.2	<i>Tipos de resistencia</i>	70
1.11.2.3	<i>Mecanismos de resistencia</i>	70
1.11.2.4	<i>Mecanismos de transferencia de resistencia</i>	71
1.12	<i>Antibiograma</i>	72
1.12.1	<i>Discos para el antibiograma</i>	73
1.12.2	<i>Método de difusión en agar según Kirby Bauer</i>	78
1.12.3	<i>Medición de los halos de inhibición</i>	79
1.12.4	<i>Interpretación de los resultados</i>	79

CAPÍTULO II

2.	MARCO METODOLÓGICO	81
2.1	Lugar de investigación	81
2.2	Tipo de estudio	84
2.3	Población	84
2.4	Muestra	85
2.5	Tamaño de la muestra	85
2.6	Técnicas e instrumentos de recolección de datos	85
2.7	Procesamiento y plan de análisis de datos	86
2.8	Materiales, equipos y reactivos	86
2.8.1	<i>Material biológico</i>	86
2.8.2	<i>Material de Laboratorio</i>	87
2.8.3	<i>Equipos</i>	88
2.8.4	<i>Reactivos</i>	89
2.9	Métodos y Técnicas	90
2.9.1	<i>Muestreo</i>	90
2.9.2	<i>Recolección de la muestra</i>	90
2.9.3	<i>Identificación de las muestras</i>	91
2.9.4	<i>Análisis físico-químico in situ del agua termal</i>	91
2.9.5	<i>Transporte de las muestras</i>	92
2.9.6	<i>Análisis de laboratorio</i>	92

2.9.6.1	<i>Siembra de las muestras de agua termal en placas 3M Petrifilm para el recuento rápido de Aerobios, recuento de Escherichia coli y Coliformes, sistema de recuento Staph Express, recuento de mohos y levaduras.....</i>	92
2.9.6.2	<i>Siembra de las muestras de agua termal en el agar eosina azul de metileno y el agar manitol salado, recuento de las colonias crecidas y de las colonias que fermentaron la lactosa y el manitol respectivamente.....</i>	95
2.9.6.3	<i>Estabilización del aislado bacteriano.....</i>	96
2.9.6.4	<i>Siembra por agotamiento de estrías.....</i>	97
2.9.6.5	<i>Descripción de la morfología macroscópica de las colonias bacterianas crecidas en el agar Mueller Hinton.</i>	98
2.9.6.6	<i>Tinción GRAM del aislado bacteriano puro.....</i>	99
2.9.6.7	<i>Pruebas bioquímicas para la identificación bacteriana.....</i>	100
2.9.6.8	<i>Identificación de cocos Gram positivos.....</i>	104
2.9.6.9	<i>Identificación de bacilos Gram positivos.....</i>	108
2.9.6.10	<i>Identificación de bacilos Gram Negativos.....</i>	111
2.9.6.11	<i>Antibiograma.....</i>	116

CAPÍTULO III

3.	MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	128
3.1	Parámetros Físico-químicos medidos in situ del agua termal del Balneario El Cachaco.....	128

3.2	Recuento de microorganismos aerobios mesófilos presentes en las aguas termales del Balneario El Cachaco.....	131
3.3	Recuento de <i>Escherichia coli</i> y Coliformes totales presentes en las aguas termales del Balneario El Cachaco.....	135
3.4	Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> presentes en las aguas termales del Balneario El Cachaco.....	140
3.5	Recuento de mohos y levaduras presentes en las aguas termales del Balneario El Cachaco.....	142
3.6	Recuento de las colonias que fermentaron y que no fermentaron la lactosa y el manitol respectivamente.....	147
3.7	Morfología macroscópica de las colonias bacterianas crecidas en el agar Mueller Hinton.....	150
3.8	Morfología microscópica de todos los clones bacterianos aislados de las aguas termales del Balneario El Cachaco.....	152
3.9	Pruebas bioquímicas para la identificación de cocos Gram positivos.....	156
3.10	Pruebas bioquímicas para la identificación del bacilo Gram positivo de las aguas termales del Balneario El Cachaco.....	164
3.11	Pruebas bioquímicas para la identificación de los bacilos Gram negativos de las aguas termales del Balneario El Cachaco.....	166
3.12	Identificación de los clones bacterianos aislados de las muestras de agua termal del Balneario El Cachaco.....	168
3.13	Antibiograma de los cocos Gram positivos aislados de las aguas termales del Balneario El Cachaco.....	174
3.14	Antibiograma del bacilo Gram positivo aislado de las aguas termales del Balneario El Cachaco.....	180
3.15	Antibiograma de los bacilos Gram negativos aislados de las aguas termales del Balneario El Cachaco.....	182

CONCLUSIONES	185
RECOMENDACIONES	188
BIBLIOGRAFÍA	
ANEXOS	

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

CMI	Concentración mínima inhibitoria
E.M.B.	Eosina azul de metileno
ESPOCH	Escuela Superior Politécnica de Chimborazo
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
G	Gramo
INAMHI	Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología
INEN	Instituto Ecuatoriano de Normalización
m²	Metros cuadrados
Mm	Milímetros
mL	Mililitro
OMS	Organización Mundial de la Salud
pH	Potencial de hidrógeno
ug	Microgramos
UFC	Unidades formadoras de colonias
UNT	Unidad nefelométrica de turbidez
UV	Radiación ultravioleta
%	Porcentaje
°C	Grados Celsius

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1	Clasificación de las aguas termales basada en su temperatura.....	14
Tabla 2-1	Clasificación de las aguas termales basada en su residuo seco a 110°C.....	15
Tabla 3-1	Clasificación de las aguas minerales según Kurlov.....	15
Tabla 4-1	Clasificación de las aguas subterráneas naturales basada en su pH.	16
Tabla 5-1	Características de las aguas termales del Balneario El Cachaco según el INAMHI 2012.	21
Tabla 6-1	Tipos de hemólisis.....	41
Tabla 7-1	Aspectos de crecimiento de algunas enterobacterias en agar eosina azul de metileno.	44
Tabla 8-1	Aspectos de crecimiento de algunos microorganismos en agar MacConkey.....	45
Tabla 9-1	Aspectos de crecimiento de algunos microorganismos en agar <i>Salmonella-Shigella</i>	46
Tabla 10-1	Clasificación de las bacterias según su requerimiento atmosférico.	49
Tabla 11-1	Clasificación de las bacterias por su temperatura.....	50
Tabla 12-1	Reactivos de la tinción Gram, tiempo de aplicación y color de las bacterias Gram positivas y Gram negativas.....	57
Tabla 13-1	Guía para la selección de antimicrobianos para el antibiograma...	73
Tabla 14-1	Batería de discos recomendados para los antibiogramas de rutina en laboratorios clínicos.....	74
Tabla 15-1	Grupos de antimicrobianos que deberían ser incluidos en las pruebas de sensibilidad de los laboratorios clínicos según NCCLS	74
Tabla 16-1	Discos básicos que representan cada grupo de antibióticos.....	78

	Diámetro de las zonas patrón y su equivalencia con los puntos de ruptura de la concentración mínima de antimicrobianos que inhiben el crecimiento bacteriano.....	80
Tabla 17-1		
	Resultados del crecimiento del microorganismo en agar hierro de Kligler.....	113
Tabla 1-2		
	Procedimientos de identificación de cocos Gram positivos del muestreo N°1.....	119
Tabla 2-2		
	Procedimientos de identificación de cocos Gram positivos del muestreo N°1.....	121
Tabla 3-2		
	Procedimientos de identificación de los cocos Gram positivos del muestreo N°2.....	123
Tablas 4-2		
	Procedimientos de identificación de los bacilos Gram negativos del muestreo N° 1.....	126
Tabla 5-2		
	Parámetros Físico-químicos del primer muestreo del agua termal del Balneario El Cachaco.....	128
Tabla 1-3		
	Parámetros Físico-químicos del segundo muestreo del agua termal del Balneario El Cachaco.	129
Tabla 2-3		
	Recuento de aerobios mesófilos de las aguas termales muestreadas del Balneario El Cachaco.....	132
Tabla 3-3		
	Recuento de <i>Escherichia coli</i> y Coliformes totales en los sitios muestreados del Balneario El Cachaco.....	136
Tabla 4-3		
	Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> de los sitios muestreados del Balneario El Cachaco.....	140
Tabla 5-3		
	Recuento de mohos y levaduras de los sitios muestreados del Balneario El Cachaco.....	143
Tabla 6-3		
	Recuento de las colonias que fermentaron y no fermentaron la lactosa y el manitol en cada uno de sus respectivos agares.	147
Tabla 7-3		
	Morfología macroscópica de los clones aislados del agua termal del Balneario El Cachaco.....	150
Tabla 8-3		

Tabla 9-3	Morfología microscópica de los clones bacterianos aislados de las aguas termales del Balneario El Cachaco.....	152
Tabla 10-3	Pruebas bioquímicas para la identificación de los cocos Gram positivos de las aguas termales del Balneario El Cachaco.....	157
Tabla 11-3	Pruebas bioquímicas para la identificación de los cocos Gram positivos de las aguas termales del Balneario El Cachaco.....	159
Tabla 12-3	Pruebas bioquímicas para la identificación de los cocos Gram positivos de las aguas termales del Balneario El Cachaco.....	161
Tabla 13-3	Pruebas bioquímicas para la identificación del bacilo Gram positivo de las aguas termales del Balneario El Cachaco.....	164
Tabla 14-3	Pruebas bioquímicas de identificación de los bacilos Gram negativos de las aguas termales del Balneario El Cachaco.....	166
Tabla 15-3	Identificación de las colonias aisladas de las aguas termales del Balneario El Cachaco.....	168
Tabla 16-3	Antibiograma de los cocos Gram positivos aislados de las aguas termales del Balneario El Cachaco.....	174
Tabla 17-3	Antibiograma del bacilo Gram positivo aislado de las aguas termales del Balneario El Cachaco.....	180
Tabla 18-3	Antibiograma de los bacilos Gram negativos aislados de las aguas termales del Balneario El Cachaco.....	182

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1	Estructura del agua.....	8
Figura 2-1	Esquema del origen meteórico de las aguas termales.....	13
Figura 3-1	Mapa de ubicación de la parroquia Calacalí.....	18
Figura 4-1	Balneario El Cachaco.....	19
Figura 5-1	Aguas termales del Balneario El Cachaco.....	20
Figura 6-1	Morfología de las bacterias.....	33
Figura 7-1	Patrones de hemólisis.....	41
Figura 8-1	Fermentación del manitol (lado izquierdo) y ausencia de fermentación del manitol (lado derecho).....	42
Figura 9-1	Fermentación de lactosa (lado izquierdo) y ausencia de fermentación de lactosa (lado derecho).....	43
Figura 10-1	Aspectos de crecimiento de algunos microorganismos en agar MacConkey (lado izquierdo) y diferenciación de la fermentación de lactosa en el medio (lado derecho).....	45
Figura 11-1	Aspectos de crecimiento de algunos microorganismos en agar <i>Salmonella-Shigella</i>	46
Figura 12-1	Placas 3M Petrifilms.....	47
Figura 13-1	Colonias viscosas y pegajosas.....	53
Figura 14-1	Cultivos puros de microorganismos del Balneario El Cachaco.....	55
Figura 15-1	Esquema de la ultraestructura de la pared celular de las bacterias Gram positivas.....	58
Figura 16-1	Esquema de la ultraestructura de la pared celular de las bacterias Gram negativas.....	59
Figura 17-1	Antibiograma de la cepa 2-2 aislada del Balneario El Cachaco....	72

Figura 18-1	Resultados de la prueba de optoquina.....	76
Figura 19-1	Resultados de la prueba de bacitracina.....	77
Figura 20-1	Prueba de la novobiocina.....	77
Figura 1-2	Vertiente pequeña (M1).....	82
Figura 2-2	Punto 1 de surgencia del agua (M2).....	82
Figura 3-2	Piscina parte frontal (M3).....	83
Figura 4-2	Punto 2 de surgencia del agua (M4).....	83
Figura 5-2	Piscina alado de las gradas (M5).....	83
Figura 6-2	Siembra en placas 3M Petrifilm.....	95
Figura 7-2	Primer repique de las colonias procedentes de las placas 3M Petrifilm.....	97
Figura 8-2	Siembra por agotamiento de estrías.....	98
Figura 9-2	Descripción de la morfología macroscópica de las colonias.....	98
Figura 10-2	Tinción Gram.....	99
Figura 11-2	Resultados de la prueba de la catalasa.....	100
Figura 12-2	Oxidasa positiva (lado izquierdo) y oxidasa negativa (lado derecho).....	101
Figura 13-2	Resultados de la prueba de oxidación–fermentación.....	103
Figura 14-2	Resultados de la prueba de la coagulasa.....	105
Figura 15-2	Resultados del crecimiento en caldo hipersalino.....	106
Figura 16-2	Resultados de la hidrólisis de la gelatina.....	119
Figura 17-2	Prueba del almidón negativa (lado izquierdo) y prueba positiva (lado derecho).....	110
Figura 18-2	Siembra por punción y estría en el agar Kligler.....	112
Figura 19-2	Prueba del citrato positiva (lado izquierdo) y prueba negativa (lado derecho)	114

Figura 20-2	Ureasa negativa (1) y Ureasa positiva (2).....	114
Figura 21-2	Resultados de la motilidad en agar SIM.....	115
Figura 22-2	Resultados de la producción de H ₂ S en agar SIM.....	116
Figura 23-2	Resultados de la prueba del indol.....	116
	Esquema de la metodología general del estudio microbiológico realizado en las aguas termales del Balneario El Cachaco ubicado en la parroquia Calacalí de la provincia de Pichincha.....	118
Figura 24-2		
Figura 25-2	Esquema de identificación del bacilo Gram positivo.....	125

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-3	Promedios del recuento de aerobios mesófilos en los sitios muestreados del Balneario El Cachaco.	132
Gráfico 2-3	Promedios del recuento de Coliformes totales de los sitios muestreados del Balneario El Cachaco.....	137
Gráfico 3-3	Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> en los sitios muestreados del Balneario El Cachaco en el primer y segundo muestreo.....	141
Gráfico 4-3	Resultado total de mohos y levaduras en los puntos muestreados en el primer y segundo muestreo.	144
Gráfico 5-3	Porcentaje total de las colonias que fermentaron y no fermentaron la lactosa y manitol en sus respectivos agares.....	148
Gráfico 6-3	Porcentaje de clones bacterianos según su morfología y tinción Gram.....	153
Gráfico 7-3	Porcentaje total de cada microorganismo encontrado en las aguas termales del Balneario El Cachaco.....	170

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A	Balneario “El Cachaco”
ANEXO B	Puntos muestreados para el estudio microbiológico
ANEXO C	Medición in situ de los parámetros fisico-químicos del agua termal
ANEXO D	Siembra de las muestras de agua termal en las placas 3M Petrifilm, en el agar eosina azul de metileno y en el agar manitol salado
ANEXO E	Resultados del recuento bacteriano en cada sitio muestreado transcurridas 24 horas. (primer muestreo)
ANEXO F	Resultados del recuento bacteriano en cada sitio muestreado transcurridas 24 horas. (segundo muestreo)
ANEXO G	Algunas colonias bacterianas que se seleccionaron para los repiques
ANEXO H	Repiques de las colonias bacterianas
ANEXO I	Siembra de las colonias bacterianas por agotamiento de estrias
ANEXO J	Clones bacterianos puros
ANEXO K	Tinción Gram de los clones bacterianos puros
ANEXO L	Prueba de la catalasa y oxidasa de los clones bacterianos puros
ANEXO M	Prueba de la oxidación fermentación
ANEXO N	Siembra en agar sangre e identificación de hemólisis
ANEXO Ñ	Pruebas de identificación de los cocos Gram positivos
ANEXO O	Pruebas de identificación del bacilo Gram positivo
ANEXO P	Pruebas de identificación de los bacilos Gram negativos
ANEXO Q	Antibiogramas de las especies bacterianas identificadas

RESUMEN

Factores externos al agua termal pueden cambiar sus propiedades físico-químicas y su calidad microbiológica, el presente estudio microbiológico se realizó en muestras de agua termal del Balneario El Cachaco de la parroquia Calacalí provincia de Pichincha, con el objetivo de determinar la microbiota autóctona y alóctona que poseen estas aguas y su perfil de resistencia a varios antibióticos. Se efectuó un análisis físico-químico en el que se determinó la temperatura y el pH y un análisis microbiológico mediante la siembra en placas Petrifilm para aerobios mesófilos, *Escherichia coli* y coliformes, *Staphylococcus aureus*, mohos y levaduras y en los agares eosina azul de metileno y manitol salado, luego se realizó un recuento de las colonias, descripción macroscópica y selección de las más representativas, para obtener los clones bacterianos puros se utilizó el método de siembra por agotamiento y repique en agar Mueller Hinton, la identificación bacteriana se efectuó mediante tinción Gram y pruebas bioquímicas, el antibiograma se realizó utilizando el método de difusión en agar. Las aguas termales fueron clasificadas como hipotermales y neutras, hubo ausencia de *Escherichia coli* y predominio de cocos Gram positivos. Los 25 aislados bacterianos identificados correspondieron a las especies *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus viridans*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus saprophyticus* y a los géneros *Corynebacterium*, *Campylobacter* y *Pseudomonas*. En relación al antibiograma todos los cocos Gram positivos fueron sensibles a la gentamicina, imipenem y ciprofloxacina, el bacilo Gram positivo fue sensible además de los antibióticos mencionados a la kanamicina, todos los bacilos Gram negativos fueron sensibles al imipenem y a la ciprofloxacina. En conclusión el agua termal no representa un grave riesgo sanitario para los usuarios, sin embargo se deben tomar medidas que ayuden a disminuir la contaminación del agua termal y realizar estudios microbiológicos frecuentes que garanticen su calidad sanitaria.

Palabras clave: <TECNOLOGÍA Y CIENCIAS DE LA INGENIERÍA>, <BIOQUÍMICA>, <ESTUDIO MICROBIOLÓGICO>, <AGUA TERMAL>, <MICROBIOTA>, <CALIDAD SANITARIA>, <CALACALÍ (PARROQUIA)>, <PICHINCHA (PROVINCIA)>

ABSTRACT

External factors can change the physical-chemical properties to the thermal water and its microbiological quality, the present microbiological study was carried out in samples of thermal water of the El Cachaco Spa of the Calacalí parish of Pichincha province, with the objective of determining the autochthonous and allochthonous microbiota that these waters possess and their profile of resistance to several antibiotics. A physical-chemical analysis was carried out in which the temperature and pH were determined and a microbiological analysis was carried out by the sowing in the Petrifilm plates for mesophilic aerobes, *Escherichia coli* and coliforms, *Staphylococcus aureus*, molds and yeasts, and in blue eosin agars of methylene and salty mannitol, then a colonies count was done, macroscopic description and selection of the most representative, to obtain pure bacterial clones was used the method of sowing by depletion and peal on Mueller Hinton agar, bacterial identification was affected by staining Gram and biochemical tests, the antibiogram was performed using the agar diffusion method. The thermal waters were classified as hypothermal and neutral; there was absence of *Escherichia coli* and predominance of Gram positive coccus. The 25 identified isolated bacterial corresponded to the species *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus viridans*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus saprophyticus* and the gender *Corynebacterium*, *Campylobacter* and *Pseudomonas*. In relation to the antibiogram, all Gram positive coccus were sensitive to gentamicin, imipenem and ciprofloxacin, Gram positive bacillus were sensitive in addition to the antibiotics mentioned to kanamycin, all Gram negative bacillus were sensitive to imipenem and ciprofloxacin. In conclusion, thermal water does not represent a serious health risk for users; however, measures should be taken to reduce thermal water contamination and to carry out frequent microbiological studies to guarantee its sanitary quality.

Keywords: < ENGINEERING TECHNOLOGY AND SCIENCES>, >BIOCHEMISTRY>, <MICROBIOLOGICAL STUDY>, <THERMAL WATER>, >MICROBIOTA>, <SANITARY QUALITY>, < CALACALI (PARISH)>, <PICHINCHA (PROVINCE)>

INTRODUCCIÓN

En la antigüedad el hombre creía que la enfermedad era un espíritu malo que ocupaba su cuerpo enviado por su Dios como castigo por haberlo ofendido, lo cual era curado a través del consumo de agua originaria de los abismos de la tierra. En los períodos arcaicos las civilizaciones se bañaban como medida curativa a sus enfermedades o simplemente para socializar. (Rivera, 2011)

En la edad de piedra el hombre primitivo conocía los beneficios que las aguas termales aportaban a la salud, se encontraron pruebas de que en el año 2000 A.C existían balnearios de aguas termales en la ciudad de Mojenjo-Daro en la India y en la ciudad de Epidauros en Grecia así como también en la isla griega de Creta y en la ciudad de Tel El-Amarna en Egipto. Por otro lado los Incas veneraban el agua y también la usaban en rituales para bañarse, purificarse y mejorar su salud. (Rivera, 2011) (TermalismoUruguay, 2016)

El agua termal se comenzó a usar hacia finales del siglo V A.C., aparecieron varias clases de termas como las terapéuticas o balnearios de aguas termales las cuales además tenían un significado simbólico sagrado y los baños públicos como por ejemplo el de Caracalla y Diocleciano ubicados en Roma. (Caldaria, 2016) (TermalismoUruguay, 2016)

El emperador Agripa diseñó en Roma las primeras termas públicas en edificios comunitarios pequeños los cuales fueron denominadas *balneas termas*, también se construyeron espacios de baños privados denominados *balmes* o *balneum* y de baños públicos conocidos como *thermae* o *therma*. (Caldaria, 2016)

Cuando las personas acudían a estos balnearios colocaban su ropa en un vestuario e ingresaban desnudos a las salas de aguas tibias conocidas como *tepidarium*, luego pasaban a las piletas con agua caliente o *caldarium*, no usaban jabón sino aceites esenciales, por último pasaban a las *frigidarium* que eran semejantes a piscinas pero de agua fría. (Caldaria, 2016) (TermalismoUruguay, 2016)

Las termas se expandieron en Europa durante la dominación romana, por otro lado en la edad media la iglesia cristiana pensaba que los balnearios termales de Roma eran un lugar de perversión

pues era más importante la limpieza del espíritu, por lo que en la etapa medieval el uso de las aguas termales disminuyó. (TermalismoUruguay, 2016)

En Escandinavia al contrario cada casa tenía su sauna el cual constaba de una habitación de madera con un banco colocado en las paredes y empleaban baños de agua templada y agua helada. (TermalismoUruguay, 2016)

Los baños termales se incorporaron nuevamente con la invasión de los árabes al sur de Europa pero con la reconquista de España por reyes católicos se volvieron a prohibir estos baños, en cambio en Constantinopla perduraron y en las Cruzadas se usaban las aguas termales para curar heridos y tratar enfermedades. (TermalismoUruguay, 2016)

En los siglos XVII y XVIII los médicos Ovelgün y Hoffman estudiaban la hidroterapia y le dieron impulso a la misma, a finales del siglo XVIII los médicos Sigmund y Johann Hahn patrocinaban la hidroterapia como método preventivo y tratamiento terapéutico de muchas enfermedades. En el siglo XIX Priessnitz y Kneipp continuaron con la hidroterapia misma que la aplicaban en personas enfermas. (Introducción al termalismo, 2006)

En la actualidad la Hidrología Médica como una ciencia Terapéutica se apoya en otras disciplinas como Ciencias Naturales, Química, Fisiología, Farmacia; una de sus ramas es la Crenoterapia que estudia las aguas minerales y termales para el tratamiento de enfermedades. Se conoce el origen, la composición química de las aguas, los beneficios que aportan a la salud, pero a pesar de esto han perdido el lugar que antes ocupaban por los adelantos de la Medicina. (Introducción al termalismo, 2006)

En el siglo XIX inició el estudio microbiológico del agua enfocándose principalmente en los microorganismos patógenos para controlar las enfermedades. Las primeras investigaciones en aguas minerales fueron realizadas en España en el año de 1838, dirigidas a conocer cuáles eran las condiciones de existencia de los microorganismos saludables así como también comprobar si existía o no en ellas bacterias patógenas. (Introducción al termalismo, 2006)

Gracias a estudios microbiológicos de aguas termales se han aislado nuevas bacterias termófilas, las cuales podrían ser útiles en el campo de la biotecnología pues sus enzimas resisten elevadas temperaturas. (De La Rosa Y Mosso, 2000, pp. 154-155)

Lagarto y Bernal (2002) en un estudio acerca de la utilización terapéutica de las aguas y fangos mineromedicinales mencionan que las aguas de los balnearios tienen una composición química, concentración de sales disueltas y temperatura características de cada una, según las cuales se las puede clasificar y de las que depende sus propiedades terapéuticas.

Otras investigaciones como la realizada por De La Rosa y Mosso (2000, p. 153) han permitido determinar que en las aguas minerales termales de los balnearios existe una microbiota autóctona dependiente de las propiedades fisicoquímicas del agua, así como microorganismos alóctonos que provienen de otros hábitats.

Vendrell et al. (1998, p.94) en un estudio de los microorganismos patógenos en la fuente termal de O Tinteiro en Ourense, encontraron patógenos humanos como coliformes fecales, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus*, *Clostridium*, *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de aguas residuales que desembocan en sitios cercanos a la fuente o en ella por infiltraciones en el suelo, que hace que el agua no sea potable.

A nivel del Ecuador el Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología (INAMHI) se encuentra realizando estudios hidrogeológicos en los que monitorean las fuentes termales del país para caracterizarlas mediante parámetros físico-químicos y la composición iónica. (Burbano, 2013)

Además de los estudios anteriores podemos mencionar la investigación realizada por Andueza y colaboradores (2015, p.160) acerca de la resistencia antimicrobiana en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de aguas termales de la provincia de Chimborazo Ecuador, en donde no solo encontraron presencia de *Pseudomonas aeruginosa* sino también de *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas stutzeri*.

Las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* fueron sometidas a un perfil de resistencia a los antibióticos a través del método de difusión de Kirby Bauer, en donde todos los microorganismos mostraron sensibilidad a la vancomicina y resistencia a la ampicilina y ampicilina-sulbactam,

siendo además una parte de estas cepas resistentes a otros los antibióticos (amikacina, ceftazidime, cefepime y ciprofloxacina). (Andueza, 2015, p. 160)

El turismo terapéutico ha constituido desde siempre una de las motivaciones del desplazamiento de las personas hacia lugares curativos donde puedan tratar sus enfermedades, el balnearismo es la forma más antigua de turismo de aguas curativas a más de ser una forma de turismo recreativo, permitiendo a sus usuarios liberarse del estrés de cada día y de su vida rutinaria. (Caldaria, 2016)

El Ecuador por encontrarse ubicado en el Círculo de Fuego del Pacífico cuenta con una gran actividad magmática y flujos térmicos en la corteza terrestre que otorgan a las aguas subterráneas una elevada temperatura y alto grado de mineralización, saliendo a la superficie en forma de manantiales de agua caliente en especial en las regiones andina e interandina del país. (Burbano, 2015, p. 111)

Una parte importante del desarrollo económico del país se basa en este tipo de turismo, en su mayoría en la visita a nuestros recursos naturales como son los balnearios de agua termal, los cuales han sido utilizados desde épocas antiguas por sus propiedades medicinales y relajantes, uno de estos es el Balneario El Cachaco de la parroquia de Calacalí de la provincia de Pichincha.

En la actualidad el balneario El Cachaco no cuenta con una apropiada infraestructura turística encontrándose al aire libre, sus aguas termales están expuestas a contaminación por factores externos como son los excrementos de los animales que viven en la naturaleza selvática del lugar, inclusive por la microbiota que acarrean las personas en sus pies así como también en su cuerpo y que se queda en el agua termal tras el ingreso a la misma.

Todos los factores contaminantes mencionados producen un cambio en la microbiota autóctona de las termas del balneario, causando además en los usuarios que se exponen de manera directa alguna clase de afección en su salud, especialmente en personas ancianas, niños, con un bajo sistema inmune, lesiones, enfermedades autoinmunes, quemaduras, escasa microbiota cutánea normal, alcalinización de la piel o alguna infección cutánea por donde los microbios patógenos puedan ingresar y agravar la salud del usuario.

Los microorganismos patógenos que pueden transmitirse mediante el agua son un grave problema de salud a nivel mundial, por lo cual es necesario que se realicen controles microbiológicos e implementar normas que garanticen la calidad del agua y disminuya el riesgo de enfermedades.

Otro aspecto importante es la intervención del hombre sobre el medio ambiente, lo cual han generado que las aguas termales se contaminen de residuos químicos, antibióticos y de agentes antibacteriales que han ocasionado que los microorganismos sean resistentes a los medicamentos; las bacterias adquieren resistencia mediante una transferencia horizontal de genes, el proceso de conjugación en el que se intercambian plásmidos o por transformación. (Andueza, 2015, p.158.) (García, 2001, pp.101-102) (Cabrera, 2007, 149) (Pedrique, 2002)

Como se mencionaba anteriormente las aguas termales son usadas a menudo para tratar los problemas de salud en la población por lo que no deben presentar un riesgo a la misma, la Organización Mundial de la Salud (OMS) define a la salud como "el estado de completo bienestar físico, mental y social y no solamente la ausencia de afecciones o enfermedades". (Alcántara, 2008, p. 96)

En nuestro país la Constitución de la República del Ecuador 2008 en el título II de los derechos, en el artículo 14 menciona que "*Se reconoce el derecho de la población a vivir en un ambiente sano y ecológicamente equilibrado, que garantice la sostenibilidad y el buen vivir, *sumak kawsay**".

Además de acuerdo al Plan Nacional para el Buen Vivir 2013-2017 se menciona que el Buen Vivir o *Sumak Kawsay* es una vida llena de felicidad y el mantenimiento de la variedad cultural y ambiental es decir se basa en la equidad con respeto a la diversidad en búsqueda de una mejor calidad de vida como lo menciona su objetivo número 3.

Es así que es necesario realizar el presente estudio microbiológico en las aguas termales del balneario El Cachaco, el cual está orientado a determinar la microbiota tanto autóctona como alóctona que posee y su perfil de resistencia a los antibióticos, pues no existen estudios microbiológicos realizados anteriormente en estas aguas termales que garanticen a los usuarios su calidad microbiológica y seguridad sanitaria.

La situación en la que se encuentra actualmente el balneario El Cachaco influye para que este sea una fuente de microorganismos los cuales pueden o no ser patógenos, por lo cual si no se realiza este estudio microbiológico los usuarios no solo estarían expuestos a contraer enfermedades que involucren su salud, sino que estas podrían transmitirse e incluso causar complicaciones más severas.

Además el aumento de la resistencia de las bacterias a los antibióticos puede provocar enfermedades difíciles de tratar, es así que el Centro de Control de Enfermedades (CDC) menciona que cerca del 70% de las infecciones de los pacientes hospitalizados presenta resistencia a los antibióticos, la Organización mundial de la Salud (OMS) menciona que en el año 2012 se incrementó la resistencia a los medicamentos contra el VIH. (FDA, 2007) (Pérez, 1998, p.58) (Meade, 2001)

En el año 2013 aparecieron casos de tuberculosis multirresistente, además las infecciones frecuentes se han vuelto resistentes lo cual puede llegar a ser mortal ya que se anula la acción de los antibióticos, disminuyen las cepas susceptibles a los mismos y se incrementa la propagación de bacterias resistentes. (Meade, 2001)

La presente investigación en las aguas termales del balneario El Cachaco será de campo y de laboratorio, en la que se recolectarán muestras de agua termal de los sitios más representativos del balneario como son los puntos donde emerge el agua (M2 y M4), la piscina (M3 y M5) y una vertiente pequeña (M1) como se detalla en el apartado de la metodología, además se realizará un análisis físico-químico in situ.

Luego las muestras serán transportadas al laboratorio de Análisis Bioquímicos y Bacteriológicos de la Facultad de Ciencias-ESPOCH, cada muestra será inoculada en el agar eosina azul de metileno, agar manitol salado, placas 3M Petrifilm para la selección de *Escherichia coli* y coliformes totales, aerobios mesófilos, mohos y levaduras y *Staphylococcus aureus*, una vez crecidas las colonias se las contará y describirá su morfología macroscópica.

Se tomarán colonias representativas, se las estabilizará mediante repiques en agar Mueller Hinton, se sembrará por agotamiento de estrías y de los clones puros se realizará la tinción Gram, se seleccionaran los mejores clones y se realizarán las pruebas bioquímicas de identificación bacteriana correspondientes según se trate de cocos o bacilos Gram positivos o Gram negativos.

Igualmente se realizará el antibiograma, para esto se preparará una suspensión bacteriana que en turbidez sea semejante al estándar McFarland de 0.5, se inoculará en agar Mueller Hinton, se colocarán los discos de antibióticos, se incubará, medirá el diámetro de inhibición para compararlo con la tabla de referencia emitida por el *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) y así reportar como sensible, moderadamente sensible, intermedio o resistente a cada uno de los clones aislados.

Los discos de antibióticos que se utilizarán para el antibiograma serán: trimetoprim-sulfametoxazol 25ug, nitrofurantoína 300ug, ceftriaxona 30ug, amoxicilina + ácido clavulánico 30ug, gentamicina 10ug, imipenem 10ug, ampicilina 10ug, cefalotina 30ug, ciprofloxacina 5ug, eritromicina 15ug, penicilina 10U, oxacilina 1ug, novobiocina 5ug, ácido nalidíxico 30ug, bacitracina 0.04U, carbenicilina 100ug, kanamicina 30ug, tetraciclina 30ug, vancomicina 30ug.

Cabe mencionar que este trabajo de titulación es factible de realizar pues no requiere desmedidos recursos económicos y los materiales y reactivos son fácilmente adquiribles.

Finalmente este estudio microbiológico será una base para la búsqueda a futuro de nuevos e innovadores usos de los microorganismos presentes en el agua termal, tanto en campos biotecnológicos para mejorar sus procesos, como en la industria de alimentos o medicamentos; igualmente estos conocimientos contribuirán a realizar mejoras y cambios en la gestión sanitaria del balneario.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.1 Agua

El agua es una sustancia primordial para la existencia de la vida, ocupa tres cuartas partes de la superficie del planeta, se encuentra en forma líquida, sólida y gaseosa en una cantidad de 1.400 millones de km^3 distribuida en todo el planeta de los cuales 4,12% corresponde a las aguas subterráneas. (Carbajal y González, 2012: p. 34-36) (Marín, 2008)

El agua se encuentra formada por dos átomos de hidrógeno y uno de oxígeno con enlaces polares que establecen puentes de hidrógeno, los átomos de hidrógeno forman un ángulo de 105° , la distancia de enlace O-H es de 0,96 Å, como se observa en la figura 1-1. (Madigan, 2004, p.39) (Carbajal y González, 2012: p. 34-36)

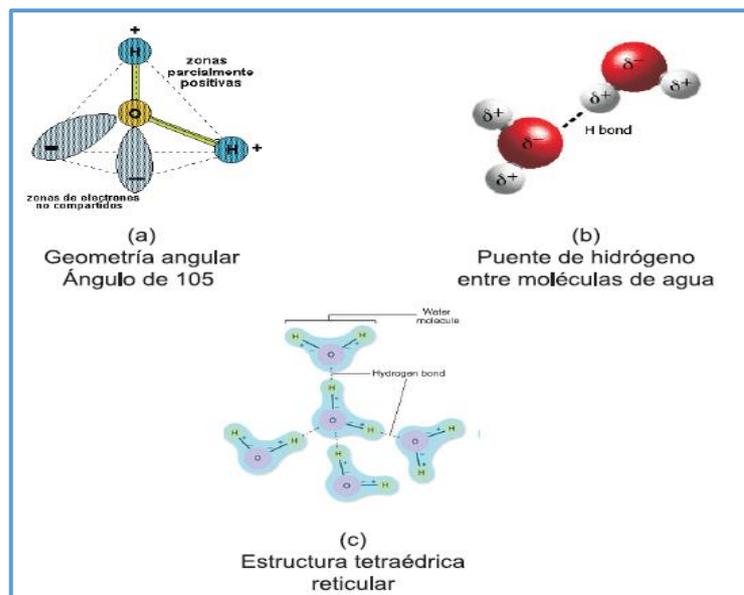


Figura 1-1: Estructura del agua

Fuente: CARBAJAL & GONZÁLEZ, 2012

1.1.1 Propiedades físicas del agua

El agua posee propiedades que dependen de su estructura y composición, a temperatura ambiente el agua es inodora, insípida e incolora sin embargo cuando se encuentra en grandes cantidades toma un leve color azul. (Barrenechea, 2004)

Entre las propiedades físicas del agua podemos destacar:

Temperatura: Depende de la absorción de radiación en las capas superiores de agua, su variación afecta la solubilidad de sales, gases, de las propiedades químicas del agua y de su microbiología. La temperatura de las aguas subterráneas depende del terreno, naturaleza de las rocas, profundidad de la que emergen y los fenómenos magmáticos que existan. (Marín, 2008) (Barrenechea, 2004)

Color: Depende del color de las sustancias que se encuentren en suspensión o disueltas en el agua como pueden ser materia orgánica generada de la descomposición de la vegetación, algún producto o metabolito que se encuentre en su interior lo que da una coloración amarilla, sales solubles de hierro y manganeso en las aguas subterráneas y superficiales poco oxigenadas principalmente que origina su color característico. (Marín, 2008) (Barrenechea, 2004)

Olor-sabor: Estas dos características dependen de si los compuestos que las generan son de origen natural es decir si provienen de gases, sales, compuestos inorgánicos u orgánicos generados de la actividad vital de los organismos que viven en el agua; o si son de origen artificial que también pueden ser orgánicos e inorgánicos. (Marín, 2008) (Barrenechea, 2004)

Dentro de los compuestos inorgánicos tenemos el H_2S que da un olor a huevos podridos y un poco a moho o pantano características de aguas poco oxigenadas y profundas de lagos, además la mayoría de sales y minerales como hierro, manganeso, zinc, Cl^- , SO_4^{2-} , HCO_3^- y NO_3^- generan en el agua un olor salado o metálico. (Marín, 2008) (Barrenechea, 2004)

Entre los compuestos orgánicos que generan olor puede aparecer un aceite neutro (geosmina) de olor terroso o leñoso producido por los actinomicetos, mucidona responsable del olor a moho, metil-isoborneol, metilmercaptanos, sulfuro de dimetilo, benceno etc. También los organismos que habitan en el agua pueden producir olor como hongos, bacterias, cianofíceas, especies zooplanctónicas o que ayudan a la putrefacción y descomposición de materias orgánicas. (Marín, 2008) (Barrenechea, 2004)

Turbidez: Esta propiedad depende de las materias o partículas en suspensión que se encuentre en el agua tales como arcilla, tierra, coloides orgánicos, plancton, microorganismos que pueden asociarse a minerales generados de la erosión de los suelos, rocas cubiertas de restos orgánicos, o

materia orgánica húmica. La turbidez se mide con un turbidímetro o nefelómetro, sus unidades son UNT unidades nefelométricas de turbiedad. (Marín, 2008) (Barrenechea, 2004)

La turbidez afecta la calidad estética del agua, durante el procedimiento de eliminación de microorganismos patógenos del agua a través de agentes químicos (cloro) la turbidez disminuye la eficiencia del proceso protegiendo a los microorganismos del contacto con el agente químico, por lo cual esta propiedad debe mantenerse al mínimo. (Marín, 2008) (Barrenechea, 2004)

1.1.2 Propiedades químicas del agua

El punto de fusión del agua es de 0°C y el de ebullición es de 100°C a una atmósfera de presión, el agua posee capacidad de disolución debido a que puede formar puentes de hidrógeno con grupos polares, cohesión debido a que los puentes de hidrógeno mantienen las moléculas de agua unidas lo cual forma estructuras compactas, adhesión pues puede ser atraída y se adhiere a las superficies. (Concha, 2008)

El agua en estado líquido y a presión normal de 1 atmósfera posee una densidad de 1g/cc a 4°C, la cual varía muy poco por cambios en la presión y temperatura; posee una elevada tensión superficial y capacidad calorífica de 1cal/°C por gramo pues se necesita abundante calor para elevar su temperatura, posee propiedad de capilaridad es decir de ascenso o descenso dentro de un tubo capilar. (Merino y Noriega, 2011)

En cuanto al pH del agua este se genera de un equilibrio carbónico y de la actividad de los organismos acuáticos, el agua pura generalmente tiene un pH neutro es decir 7, los ácidos naturales como es ácido sulfhídrico o ácido húmico acidificarían el agua y por otro lado la disolución de rocas y minerales de metales alcalinos y alcalinotérreos la alcalinizaría. (Marín, 2008)

Las aguas superficiales tienen un pH ente 6 a 8,5 en cambio las aguas subterráneas son más ácidas, en lagos el pH varía y disminuye con la profundidad. (Marín, 2008)

1.1.3 Propiedades biológicas

El agua es un disolvente universal, participa en las reacciones de hidrólisis, hidratación, reacciones redox, permite la difusión de las partículas en ella, funciona como termorregulador de los seres vivos, permite mantener la estructura celular, genera flexibilidad en los tejidos, es un medio de transporte en el interior de los seres vivos y lubricante de las articulaciones. (Pérez y Noriega, 2011)

1.2 Agua subterránea natural

Es el agua que se encuentra bajo la tierra que fluye a la superficie mediante filtraciones o manantiales. Ella se renueva constantemente a través de la recarga procedente de las precipitaciones, cursos superficiales de acuíferos cercanos o retornos de regadíos. (López, 2009, p.14)

1.2.1 Propiedades fisicoquímicas de las aguas subterráneas naturales

Las aguas subterráneas naturales poseen propiedades fisicoquímicas que dependen de su composición química y de acciones naturales externas, entre algunas de las propiedades tenemos:

Temperatura: La temperatura del agua subterránea es poco variable, en un sitio y momento específico representa un equilibrio entre los aportes y pérdidas de calor en ese sitio, sobre este parámetro influye de manera crucial la conductividad térmica, las variaciones diarias o estacionales de la temperatura ambiente, el caudal, el vulcanismo así como también la relación entre longitud y profundidad del acuífero es decir de su gradiente geotérmico. (Porrás, 1985, p.24)

Este gradiente indica que a mayor profundidad habrá mayor temperatura, según el mismo la temperatura incrementa 1°C cada 30 metros de gradiente geotérmico. (Barrionuevo, 2004, p.16)

pH: El pH interviene en varios procesos químicos y biológicos de las aguas subterráneas naturales, mide el nivel de acidez del agua, para las aguas neutras es de 7, las aguas ácidas tienen un pH menor a 7 y las aguas básicas mayor a 7. El pH de las aguas naturales generalmente está entre 6.5 a 8 aunque pudiera variar de 3 a 11. El pH debe ser medido in situ pues con el aumento de la temperatura este también lo hace hasta en un 8%. (Porrás, 1985, p.25)

1.2.2 Aguas minerales y mineromedicinales

Las aguas minerales son aguas naturales que poseen un caudal, temperatura, composición química y bacteriológica invariable, obtenidas de fuentes naturales o perforadas de aguas subterráneas de estratos acuíferos. De acuerdo a las normas de agua mineral estas deben contener más de un gramo de minerales disueltos por cada kilogramo de agua o algún componente especial y ausencia de microorganismos patógenos. (Fagundo y González, 2004)

Las aguas minerales medicinales gracias a sus características y composición presentan alguna actividad terapéutica que genera beneficios en la salud, la cual ha sido comprobada por comparación con otras aguas, experiencia local, estudios y experiencia médica. (Fagundo y González, 2004)

1.3 Aguas termales

Son aguas minerales que emergen del suelo a una temperatura superior en al menos 4 a 5°C a la temperatura media anual del lugar donde surgen, las aguas termales provienen de las capas subterráneas de la tierra en donde existe gran cantidad de minerales y una temperatura elevada. Estas aguas son utilizadas como tratamientos terapéuticos en forma de baños, inhalaciones, irrigaciones y calefacción. (Fagundo y González, 2004) (Burbano, 2015, p.111)

1.3.1 Origen de las aguas termales

Estudios que se han realizado mencionan que las aguas termales son frecuentemente de origen geotérmico, sus características físico-químicas dependen de los terrenos de donde provienen por tanto la temperatura y demás características hidrológicas varían, cabe mencionar que la temperatura en el punto de origen no supera de entre 35 a 40°C en la mayoría de casos. (Instituto Geológico y Minero de España, 2002)

La infiltración del agua de la lluvia es la fuente primordial de las aguas subterráneas, esta agua por gravedad desciende hacia capas profundas del subsuelo, los minerales y la temperatura característica de estas aguas se debe a su circulación a varias profundidades en las que están en contacto con materiales calientes. (Instituto Geológico y Minero de España, 2002)

La expansión del vapor de agua, gases ocluidos y disueltos y la temperatura hacen que el agua ascienda hacia zonas porosas, permeables o fisuras en las rocas llegando hasta la superficie, como se observa en la figura 2-1. (Instituto Geológico y Minero de España, 2002)

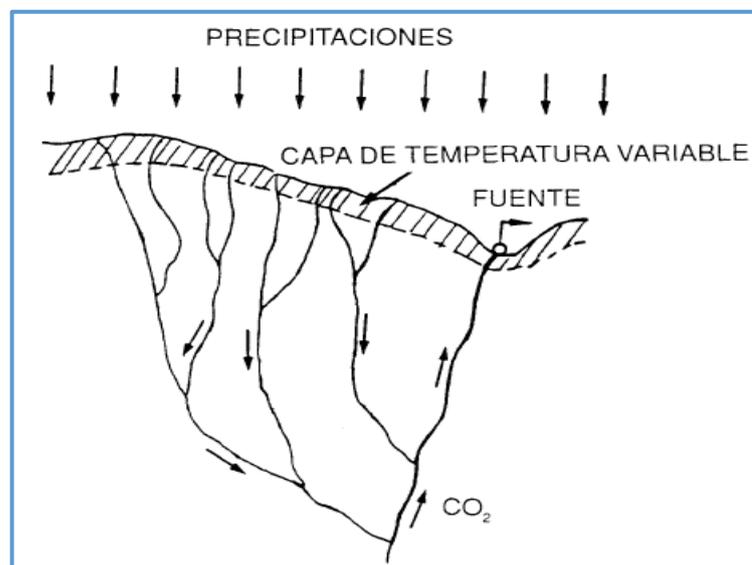


Figura 2-1: Esquema del origen meteórico de las aguas termales

Fuente: INSTITUTO GEOLÓGICO Y MINERO DE ESPAÑA, 2002

Otras aguas termales son de origen endógeno (magmático, volcánico y químico), las aguas de origen magmático provienen de la cristalización de los magmas que liberan hidrógeno, vapor de

agua, flúor, cloro, azufre, carbono, fósforo y boro que se dirigen a la superficie en forma de fumarolas que al enfriarse genera agua. (Instituto Geológico y Minero de España, 2002)

Las aguas de origen volcánico se originan de la consolidación de lavas y vapor de agua, destilación de la humedad de las rocas, gas carbónico, ácido fluorhídrico y dióxido de azufre que eliminan las capas profundas. También algunas de las reacciones químicas intensas producidas en el seno de la corteza terrestre liberan agua. (Instituto Geológico y Minero de España, 2002)

1.3.2 Clasificación de las aguas termales

Las aguas termales se clasifican de acuerdo a varios criterios entre los cuales tenemos la temperatura, mineralización global, composición, pH y origen geológico.

- **Según la temperatura**

Tomando en cuenta la temperatura media anual del aire o del suelo donde emergen las aguas termales, estas se clasifican como sigue en la tabla 1-1.

Tabla 1-1: Clasificación de las aguas termales basada en su temperatura

CLASIFICACIÓN	TEMPERATURA
Agua fría	Menor a 20°C
Agua hipotermal	Entre 20 y 30°C
Agua mesotermal	Entre 30 y 40°C
Agua hipertermal	Mayor a 40°C

Fuente: BURBANO, 2015

- **Según su mineralización global**

Las aguas termales de acuerdo a la cantidad de sólidos disueltos que contienen se clasifican como se menciona en la tabla 2-1.

Tabla 2-1: Clasificación de las aguas termales basada en su residuo seco a 110°C

CLASIFICACIÓN	CANTIDAD DE SÓLIDOS DISUELTOS
Oligominerales	Menor a 100mg/L
De mineralización muy débil	Entre 100 y 250 mg/L
De mineralización débil	Entre 250 y 500 mg/L
De mineralización media	Entre 500 y 1000mg/L
De mineralización fuerte	Mayor a 1000mg/L

Fuente: FAGUNDO, 2004

- **Según su composición**

Cuando las aguas termales superan el gramo por litro de mineralización global se clasifican tomando en cuenta su contenido aniónico y catiónico predominante en: bicarbonatadas, cloruradas, sulfatadas, sódicas, cálcicas o magnésicas siempre que el ión correspondiente sea mayor al 20% del contenido aniónico o catiónico expresado en equivalentes; si no superan el gramo por litro de mineralización global solamente se indica cuál es el ión que predomina. (Fagundo y González, 2004)

En algunas aguas termales existen elementos beneficiosos para la salud humana y aunque no sean predominantes permiten que el agua sea clasificada como aguas ferruginosas cuando tienen una concentración de hierro total mayor de 5mg/L o sulfuradas si tienen más de 1mg/L de azufre (H_2S o HS^-). (Fagundo y González, 2004)

A continuación en la tabla 3-1 se presenta la clasificación de las aguas minerales según Kurlov.

Tabla 3-1: Clasificación de las aguas minerales según Kurlov.

CON RELACIÓN A LOS ANIONES	CON RELACIÓN A LOS CATIONES
Bicarbonatadas	Cálcicas
Sulfatadas	Magnésicas
Cloruradas	Sódicas
Bicarbonatadas sulfatadas	Cálcicas magnésicas
Bicarbonatadas cloruradas	Cálcicas sódicas
Sulfatadas cloruradas	Magnésicas sódicas
Sulfatadas cloruradas bicarbonatadas	Cálcicas magnésicas sódicas

Fuente: BURBANO, 2013

- **Según su pH**

Las aguas subterráneas naturales según su pH pueden ser clasificadas como sigue en la tabla 4-1.

Tabla 4-1: Clasificación de las aguas subterráneas naturales basada en su pH

CLASIFICACIÓN	RANGO DE pH
Ácidas	Menor a 7
Neutras	7
Alcalinas	Mayor a 7

Fuente: PORRAS, 1985

- **Según su origen geológico**

Por su origen geológico las aguas termales pueden clasificarse en:

Aguas magmáticas: Como se mencionó anteriormente surgen de la relación directa con yacimientos eruptivos, son aguas primitivas que emergen de filones metálicos o eruptivos, su caudal es periódico, rítmico y constante, poseen una composición y temperatura elevada mayor a 50°C que es constante, contienen elementos característicos de emanaciones metálicas, como boro, fósforo, arsénico, bromo, cobre, nitrógeno. (Burbano, 2013) (EcuRed, 2000)

Aguas telúricas o de infiltración: Emergen de cualquier tipo de terreno, posee un caudal variado relacionado a las lluvias y a las estaciones del año que existan, su temperatura no llega a los 50°C, de baja a mediana mineralización y su concentración de minerales está contrapuesta a su caudal, estas aguas contienen sales de cal y magnesio, cloruros y bicarbonatos. (EcuRed, 2000)

1.3.3 Propiedades curativas de las aguas termales

Las aguas termales ofrecen grandes beneficios al cuerpo humano entre estos físicos, químicos y biológicos, los efectos físicos se deben en su mayoría a la temperatura del agua termal pues genera vasodilatación periférica que ayuda a la oxigenación de los tejidos, liberación de sustancias con efecto antiinflamatorio y analgésico, además de relajación muscular. (Geosalud, 2014) (Méndez, 2010)

Los efectos químicos de las aguas termales dependen de las sustancias que se encuentren en ellas, que entran en contacto con la piel e ingresan a la sangre mediante ósmosis; en cambio los efectos biológicos se deben a la acción de la flora y fauna termal además de los macro y microorganismos en unión denominado biogleas o plancton hidrotermal que incrementa el sistema inmune, repara la piel del envejecimiento y deterioro, así como también mejora las funciones vitales corporales. (Geosalud, 2014) (Méndez, 2010)

Como vemos las aguas termales aportan grandes beneficios al cuerpo humano de manera general se puede decir que:

- Incrementa las defensas del cuerpo humano y el metabolismo.
- Ayudan a depurar de toxinas del torrente sanguíneo mediante la diuresis y la sudoración.
- Dilata la red vascular.
- Revitalizan células y tejidos.
- Sedante del sistema nervioso. (Geosalud, 2014) (Méndez, 2010)

1.3.3.1 Enfermedades que pueden tratarse con las aguas termales

Las afecciones a la salud que se pueden tratar mediante el agua termal son:

- Dolor en casos de reumatismos crónicos inflamatorios, degenerativos (artrosis), para-articulares (ciáticas) y metabólicos (gota).
- Algunos traumatismos.
- Afecciones crónicas respiratorias.
- Enfermedades de la piel como dermatosis, eczemas o soriasis.
- Acidez estomacal pues la disminuyen.
- Mejoran la secreción de jugos gástricos y por ende la digestión.
- Disminuye el estrés. (Geosalud, 2014) (Méndez, 2010)

A pesar de todos los beneficios que ofrece el agua termal en ocasiones no es recomendable su uso en enfermedades agudas o brotes de reagudización de úlceras gástricas, cardiopatías descompensadas, hipertensión severa, nefritis, asma en crisis, tuberculosis, algunos tumores y cánceres. (Geosalud, 2014) (Méndez, 2010)

1.4 Parroquia Calacalí

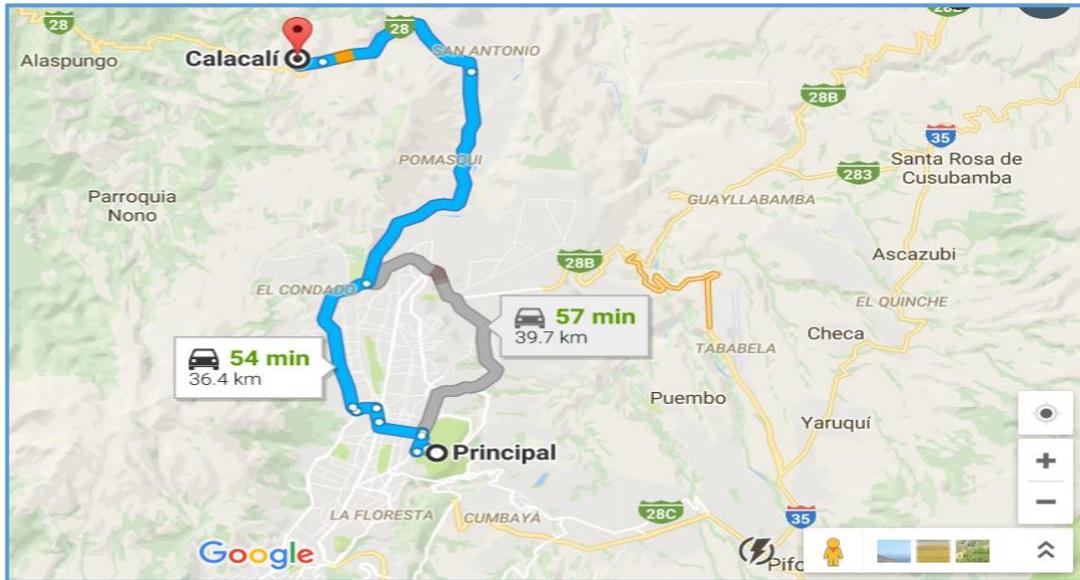


Figura 3-1: Mapa de ubicación de la parroquia Calacalí

Fuente: GOOGLE MAPS, 2016

La parroquia Calacalí se encuentra ubicada en la zona valle equinoccial, fue fundada en 1572 por el Obispo Federico González Suárez, su nombre proviene del quechua que significa manto pues desde las montañas los pobladores podían ver el manto de niebla que cubría la parroquia, según otras versiones su nombre proviene de las minas de cal que existen al norte en Chaupizacha e incluso se dice que su nombre proviene de las tribus calas-calas. (Ortiz, 2012, p.28)

Sus límites son al norte la parroquia San José de Minas, al sur la parroquia Nono, al este la parroquia San Antonio y al oeste la parroquia Nanegalito y Nanegal, en la figura 3-1 se puede ver el mapa de ubicación de la parroquia Calacalí. (Ortiz, 2012, p. 30)

Calacalí se encuentra en una zona con Clima Ecuatorial Mesodérmico Semi-Húmedo con una temperatura de 12 a 22°C, de clima frío entre 13 y 14°C durante todo el año, la estación meteorológica establece una media de 16.2°C, el punto más alto se encuentra a 2.839 metros sobre el nivel de mar, su población se encuentra en alrededor de 3895 habitantes. (Ortiz, 2012, pp.30-32)

En este lugar se encuentran 20 patrimonios intangibles de los cuales 9 son monumentos, uno de estos es el monumento original a la mitad del mundo, 2 museos y 4 haciendas. (Ortiz, 2012, p. 29) (Caldas, 2014, pp.24-27)

En el parque central de Calacalí se encuentra una pileta que data del siglo XVI, en la entrada a la parroquia se encuentra la casa de la música ecuatoriana Carlota Jaramillo actualmente convertida en museo, entre otros atractivos turísticos se encuentran la Reserva Geobotánica del Pululahua, el bosque nublado de Yunguilla y el Balneario El Cachaco. (Ortiz, 2012, p. 29) (Caldas, 2014, pp.26-27)

1.4.1 Balneario El Cachaco



Figura 4-1: Balneario El Cachaco

Realizado por: CORTES Sandra, 2016

El nombre Cachaco proviene del kichwa que significa aguas amargas, el balneario ocupa un espacio de aproximadamente 6.000m² cubiertos de césped, cuenta con dos piscinas de agua termal las cuales están adornadas de piedras pequeñas decoradas y redondas, cada una con su respectivo ojo de agua, rodeadas de flora y fauna característica del lugar, aire puro y tranquilidad como se observa en la figura 4-1, además se ofrece recorridos ecológicos por los alrededores. (Caldas, 2014, p.27)

El balneario atiende fines de semana y feriados sobretodo en carnaval en donde acuden la mayor cantidad de turistas.

1.4.1.1 Localización del Balneario El Cachaco

El Balneario El Cachaco se encuentra ubicado en la provincia de Pichincha, parroquia Calacalí a 18 kilómetros del centro de Quito, pasando las parroquias de Pomasqui y San Antonio en la entrada a Yunguilla vía a los Bancos. (Ortiz, 2012, p.30)

1.4.1.2 Aguas termales del Balneario El Cachaco



Figura 5-1: Aguas termales del Balneario El Cachaco

Realizado por: CORTES Sandra, 2016

Las aguas termales del Balneario El Cachaco han existido desde hace muchos años atrás formando parte de la hacienda Ambuasi, el propietario de la hacienda fue el que descubrió la existencia de las dos vertientes de aguas termales de color amarillo que contienen sales y hierro y que nacen en la quebrada Guadalupe.

En conocimiento de los beneficios del agua termal, el propietario de la hacienda dio apertura para que las termas estén a disposición de los habitantes de Calacalí; en donde ahora se encuentra una de las piscinas existían dos rocas gigantes de las que brotaba el agua termal, de estas rocas solamente han quedado un pequeño vestigio como se observa en la figura 5-1.

La primera piscina y la más grande fue construida hace 60 años sobre las dos rocas de donde emerge el agua termal, quedando a flote a un costado solo una pequeña parte de una de las rocas, la otra piscina pequeña fue construida hace 40 años.

Las dos piscinas fueron tomadas a cargo del Municipio de Pichincha quien designó a una persona para que cuidara del balneario, pero luego de un tiempo las piscinas quedaron abandonadas por lo cual quedaron a cargo de la Junta Parroquial de Calacalí.

Luego de varios años el señor Edgar Iván Quishpe realizó los trámites respectivos para hacerse cargo del lugar, el señor al ver el abandono de las piscinas de agua termal les dio mantenimiento poniéndoles de esta manera al servicio de los calacaleños y turistas en general.

La parroquia Calacalí está llevando a cabo acciones de recuperación de los cuerpos hídricos, que en el caso de la vertiente El Cachaco se ha ejecutado un 90% del proyecto, además falta operación, mantenimiento y personal.

Según el Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología (INAMHI) del Ecuador las aguas termales del Balneario el Cachaco presentan las características que se indican en la tabla 5-1.

Tabla 5-1: Características de las aguas termales del Balneario El Cachaco según el INAMHI 2012.

CUADRO RESUMEN DE FUENTES TERMALES INVENTARIADAS POR EL INAMHI A NIVEL NACIONAL-AÑO 2012									
Fecha	Localidad	Coordenadas		COTA	Parámetros físicos			Clasificación por temperatura	Clasificación por conductividad
		Long.	Lati.		pH	CE uS/cm	Temp. °C		
26/11/2012	Calacalí 1	773604	9998625	2638	6,39	4100	26,9	Hipotermal	Muy alta

Fuente: BURBANO, 2015

1.5 Contaminación del agua

Desde inicios del siglo XIX se hizo visible la contaminación acuática debido al incremento de la población urbana y al desarrollo industrial, es así que el agua de la naturaleza a causa de la actividad humana ha adquirido sustancias que modifican sus características y usos. (Barba, 2002, p.12)

El agua puede contaminarse por sustancias ajenas a su composición normal y esto puede ocurrir por agentes físicos como restos vegetales, ramas, tierra, etc; por agentes químicos que han sido añadidos al agua de manera artificial como residuos de las industrias que son arrojados en los mares y ríos o por agentes de tipo biológico como bacterias u otro tipo de microorganismos los cuales puede ocasionar alteraciones en el agua. (Concha, 2008)

En las piscinas los agentes contaminantes del agua pueden provenir de la deficiencia de limpieza de las instalaciones, de los materiales que se introducen en la piscina y primordialmente del usuario que al sumergirse en la piscina puede dejar materia orgánica y mineral, gérmenes saprofitos o patógenos de diversos orígenes como faríngeo, genitourinario, digestivo o cutáneo. (San Martín, 2002)

Algunos de estos microbios pueden adaptarse a las condiciones de la piscina y desarrollarse, otros pueden sobrevivir un tiempo, producir y transmitir enfermedades especialmente infecciones gastrointestinales, oftálmicas, cutáneas, otorrinolaringológicas entre otras. Los hongos pueden propagarse debido al contacto de superficies húmedas pues estos sobreviven en ambientes calientes y húmedos. (San Martín, 2002)

En las piscinas de aguas termales también existen estos agentes contaminantes del agua pero con menor intensidad que en las piscinas públicas, por lo que para evitar su contaminación deben cumplir con varios requisitos higiénicos generales sin alterar sus características, hasta la actualidad no existe una legislación internacional que permita esto pues constituye un tema difícil. (San Martín, 2002)

1.5.1 Principales contaminantes del agua

Dentro de los contaminantes del agua se encuentran los que se mencionan a continuación:

- Microorganismos patógenos (bacterias, virus, protozoos) que transmiten enfermedades y pueden ocasionar la muerte, estos microbios llegan al agua del suelo, heces u otros restos orgánicos generados por las personas infectadas donde pueden sobrevivir aunque la mayoría de ellos no proliferan. (Sanchón, 2011) (Barba, 2002, p.17)

Luego de que estos agentes patógenos abandonaron al hospedador disminuye tanto su capacidad infecciosa como su número hasta que su presencia ya no se detecta. (Sanchón, 2011)

- Desechos orgánicos que podrían ser descompuestos por microorganismos aerobios, proliferando estos microorganismos y disminuyendo la cantidad de oxígeno en el agua, para medir estos desechos en el agua podemos tomar en cuenta el oxígeno disuelto OD en agua o la Demanda Biológica de Oxígeno DBO. (Sanchón, 2011) (Barba, 2002, p.17)
- Sustancias químicas inorgánicas como sales, ácidos y metales tóxicos que en concentraciones elevadas pueden causar grandes daños a los seres vivos. (Sanchón, 2011) (Barba, 2002, p.17)
- Nutrientes vegetales inorgánicos como los nitratos y fosfatos que cuando se encuentran en elevadas cantidades generan un crecimiento descontrolado de algas, que al morir se descomponen por acción de los microbios que al mismo tiempo utilizan el oxígeno del agua. (Sanchón, 2011)
- Compuestos orgánicos que tienen estructuras moleculares complejas que no pueden degradar los microbios, por lo tanto permanecen por un prolongado tiempo en el agua como por ejemplo petróleo, gasolina, plaguicidas, detergentes, disolventes. (Sanchón, 2011) (Barba, 2002, p.17)
- Sedimentos y materiales suspendidos constituyen la principal fuente de contaminación de las aguas, generan turbiedad lo cual dificulta la vida de otros seres vivos. (Sanchón, 2011) (Barba, 2002, p.17)
- Sustancias radioactivas. (Sanchón, 2011) (Barba, 2002, p.18)

- Descargas domésticas en especial en poblaciones que no cuentan con un servicio de alcantarillado. (Sanchón, 2011)

Todo esto podría alterar la apariencia estética del agua, dañar un ecosistema o afectar a la salud humana. (Barba, 2002, pp.12-14)

1.5.2 Control de calidad de las aguas termales

Es primordial conocer las características físicas, composición química y la calidad microbiológica de las aguas termales pues estas determinan sus propiedades y aplicaciones, factores externos pueden ocasionar cambios en los mismos, por lo tanto es necesario realizar controles y comprobaciones de manera periódica. (Rodés, 2001, p.76)

Entre las principales causas que pueden influenciar cambios en las características del agua termal tenemos:

- Caudal: Puede ser afectado por movimientos sísmicos, presas, pozos, entre otros que disminuyen o interrumpen el caudal de agua termal en el sitio de donde emerge. (Rodés, 2001, pp.76-77)
- Temperatura: Esta puede variar en el punto de emergencia ya sea por fenómenos que ocurren en el subsuelo o por mezcla con aguas de precipitaciones infiltradas, por lo tanto es esencial conocer la variación estacional a través de mediciones continuas. (Rodés, 2001, p.77)
- Composición química: Las aguas termales presentan una composición estable con pequeñas variaciones lo cual nos permite identificar de manera rápida alguna anomalía. (Rodés, 2001, p.78)
- Oligoelementos: Están presentes en las aguas minerales en una cantidad menor a 1mg/L, algunos de ellos son imprescindibles en la salud humana otros no pero facilitan funciones orgánicas e incluso unos cuantos son tóxicos. (Rodés, 2001, pp.78-79)
- Microbiología: Las aguas termales no son estériles, tienen una microbiota que se ha adaptado a las características del agua como la temperatura, nutrientes, oxigenación, pH entre otros. (Rodés, 2001, pp.79-80)

Además las aguas termales se pueden contaminar con microorganismos alóctonos que provienen de capas superiores del suelo, llevados hacia la profundidad del suelo a través de las aguas de infiltración las cuales se mezclan con el agua de origen profundo. (Rodés, 2001, pp.79-80)

Entre los microorganismos que pueden contaminar el agua termal se encuentran los coliformes, enterococos, clostridios, que indican la ausencia de protección en el sitio donde surge o es captada el agua, gérmenes patógenos como la *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* o *Pseudomonas aeruginosa* que constituyen un grave riesgo sanitario. (Rodés, 2001, pp.79-80)

La aparición de alguna de las bacterias mencionadas en el agua termal requiere tomar medidas inmediatas que permitan su eliminación, así como también prevenir las causas de la contaminación. (Rodés, 2001, pp.79-80)

- Radioactividad: Si la radioactividad es elevada es importante conocer cuáles son los radioisótopos responsables de la misma. (Rodés, 2001, p.80)
- Presencia de *Legionella pneumophila*: Resulta esencial controlar su posible aparición en las aguas termales pues podría ocasionar la muerte o síntomas graves en los bañistas. (Rodés, 2001, p.81)

1.5.2.1 Indicadores microbiológicos de la calidad del agua

Los microorganismos indicadores de la calidad del agua son aquellos que demuestran la presencia de una especie de bacterias patógenas ya que se comportan de manera semejante a estos últimos en cuanto a su concentración y reacción frente a factores ambientales, además indican que existen ciertas condiciones en el medio y pueden afectar de alguna manera la salud humana. (Guías para la calidad del agua potable, 2006) (Pullés, 2014, p.26) (Arcos, 2005, p.71)

Conocer el tipo de microorganismo que se encuentra en el agua y su concentración permite determinar la calidad de la misma, además de tomar medidas para evitar la contaminación de las personas y al ambiente. (Guías para la calidad del agua potable, 2006)

Para medir la calidad microbiológica del agua se determina el número de bacterias indicadoras de contaminación fecal como la *Escherichia coli*, además de microorganismos como los coliformes,

enterococos intestinales, *Clostridium perfringens*, bacteriófagos entre otros que según la OMS no deben existir en el agua de consumo humano. (Pullés, 2014, pp27-28)

Entre los grupos de microorganismos que se utilizan como indicadores de la calidad del agua potable tenemos:

Coliformes: Estos microorganismos son contaminantes comunes del tracto gastrointestinal del hombre y de los animales de sangre caliente, pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*, son bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos, no esporulados, fermentadores de lactosa a 35°C con producción de gas luego de 24 a 48 horas de incubación, oxidasa negativos, pueden vivir en el suelo, agua, vegetales u otros ambientes. (Madigan, 2004, p.927-928) (Pullés, 2014, p.27) (Arcos, 2005, p.72)

La presencia de coliformes en el agua indica contaminación bacteriana reciente y no se encuentran asociados de manera directa con la contaminación fecal por lo cual no constituyen un grave riesgo para la salud. (Pullés, 2014, p.27) (Arcos, 2005, p.72)

Los coliformes se dividen en dos grupos, un grupo formado por los coliformes totales de los géneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Edwardsiella* y *Citrobacter* que viven como saprófitos de manera independiente o como bacterias intestinales. El otro grupo lo conforman los coliformes fecales como la *Escherichia coli* y ciertas especies de *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Citrobacter* las cuales están relacionadas con la contaminación fecal. (Arcos, 2005, p.72)

Según Arcos et al. (2005, p.73) la cantidad de coliformes totales debe ser explicada según el tipo de agua, en las muestras de aguas potables debe haber una ausencia del 85%, su presencia en aguas tratadas indica si hubo o no contaminación, falla en el tratamiento, distribución o en la fuente pero sin detectar el origen de la misma.

Los coliformes fecales no se multiplican en ambientes acuáticos ya que sufren un estrés fisiológico, la velocidad de mortalidad se ve influenciada por la temperatura del agua, luz solar, presencia de otras bacterias y la composición química del agua, pueden generar infecciones respiratorias, bacteriemia, infecciones de piel y tejidos blandos, diarrea aguda, etc. (Arcos, 2005, p.72)

En ocasiones cuando se sabe que existe contaminación fecal pero no se detectan coliformes debido a las descargas de agua frecuentes o descargas antiguas en las que mueren los coliformes

fecales y la *Escherichia coli*, es útil recurrir a la determinación de *Enterococcus* ya que estos también se encuentran en las heces de personas y animales de sangre caliente que además son persistentes en ambientes acuáticos y suelos contaminados. (Arcos, 2005, p.73)

Las especies de *Enterococcus* de las heces fecales y que están presentes en el agua contaminada se clasifican en dos grupos, un grupo formado por los *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* y *Enterococcus durans*, el otro grupo lo conforman los *Streptococcus bovis*, *Streptococcus equinus* y *Enterococcus avium* que no son específicos de las heces humanas. (Arcos, 2005, p.73)

En el año de 1986 la U.S. *Environmental Protection Agency* recomendó el uso de los *Enterococcus* como indicadores de la contaminación fecal de las aguas recreacionales pues estos microorganismos producen enfermedades relacionadas con la natación en aguas marinas y dulces. (Arcos, 2005, p.73)

***Escherichia coli*:** Es uno de los principales indicadores de contaminación fecal, su hábitat es el intestino de los vertebrados por lo cual está presente en las heces de los humanos y animales de sangre caliente, la contaminación con este microorganismo implica el riesgo de que se encuentren en el agua patógenos entéricos que pueden ocasionar daño en la salud. (Pullés, 2014, p.27) (Guías para la calidad del agua potable, 2006)

***Clostridium sulfito reductores*:** Bacilos Gram positivos, anaerobios, produce esporas que le permite soportar condiciones ambientales adversas como altas temperaturas, desecación, pH extremos, falta de nutrientes e incluso la desinfección, constituyen un indicador de la contaminación fecal antigua. (Arcos, 2005, p.73)

Clostridium perfringens: Este microorganismo no es patógeno en el tracto intestinal de los animales de sangre caliente, su hábitat son las heces fecales, el suelo y el agua contaminada, su presencia en el agua potable indica fallos en el tratamiento o desinfección. (Pullés, 2014, p.28) (Arcos, 2005, pp.73-74)

***Pseudomonas*:** Bacilos Gram negativos, estos microorganismos tienen flagelos polares, pueden producir un pigmento fluorescente, no forman esporas, oxidasa positivo, no producen gas y usan la glucosa por vía oxidativa. Su hábitat común es el suelo y agua, algunas especies son patógenas para las personas y animales. Dentro de las especies más importantes tenemos *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. maltophilia*, *P. stutzeri*. (Arcos, 2005, p.74)

P. aeruginosa: Es un microorganismo que proviene de las heces de personas y animales, su presencia en el agua está relacionada con la contaminación de la misma con aguas residuales, puede sobrevivir varios meses en el agua a temperatura ambiente, es un patógeno oportunista responsables de infecciones de oídos, ojos y piel, su control en aguas de uso recreacional es obligatorio en algunos países. (Guías para la calidad del agua potable, 2006, p.202) (Arcos, 2005, p.74)

Aeromonas: Bacilos pequeños Gram negativos, poseen flagelos polares, fermentan los hidratos de carbono, catalasa y oxidasa positivas, hidrolizan la gelatina y reducen nitratos, para crecer necesitan poca cantidad de nutrientes, habitan en el agua, en las aguas de desecho se encuentran en gran cantidad. Entre las especies asociadas a infecciones en el ser humano están las *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas sobria*, *Aeromonas veronii* y *Aeromonas schubertii*. (Arcos, 2005, p.74)

Staphylococcus aureus: Especie bacteriana Gram positiva en forma de cocos agrupados en racimos, inmóviles, anaerobia facultativa, coagulasa y catalasa positiva, no esporulada, se encuentra en el ambiente, aire, agua, la piel, cabello, mucosas, fosas nasales, garganta, lesiones de humanos u otros mamíferos, su presencia indica un riesgo potencial para la salud pues si los estafilococos se presentan en un número elevado esto puede indicar que existen toxinas termoestables como son las enterotoxinas estafilocócicas que afectan al tracto gastrointestinal entre otras. (Guías para la calidad del agua potable, 2006, p.205)

Aerobios mesófilos: Grupo heterogéneo conformado por bacterias, mohos y levaduras que crecen a una temperatura de 30 a 40°C de manera óptima a 35°C, su presencia determina la calidad sanitaria y condiciones higiénicas del agua, un recuento bajo no asegura la ausencia de patógenos o sus toxinas y un recuento elevado no indica que existen patógenos. (Análisis microbiológico de los alimentos, 2014, pp.5-6)

Bacterias heterótrofas: Se encuentran en grandes cantidades en el agua debido a su capacidad de adaptación, indican cual es la carga total bacteriana del agua mediante el recuento de bacterias viables a 37°C luego de que fueron incubadas durante 48 horas, el estudio de estas bacterias junto con los coliformes permite determinar la calidad del tratamiento o su fracaso. (Pullés, 2014, p.28)

Mohos y levaduras: Microorganismos eucariotas, aerobios, que se encuentran distribuidos en el ambiente y se dispersan por el aire y el polvo. Los hongos y las levaduras son de lento crecimiento y de baja competitividad, se desarrollan en pH bajos (<5), poca humedad, elevada cantidad de sales o carbohidratos, bajas temperaturas y donde existan antibióticos. (Camacho, 2009)

Los mohos son hongos multicelulares filamentosos que poseen un micelio verdadero, de aspecto aterciopelado o algodonoso sobre los alimentos; en cambio las levaduras son hongos unicelulares cuyo aspecto puede ser globosas, cilíndricas, ovoides, piriformes, alargadas o adheridas. (Winn, 2006, p.3) (Camacho, 2009)

Los hongos elaboran micotoxinas, estos microorganismos se relacionan con alergias e infecciones en personas inmunocomprometidas, niños y ancianos. (Camacho, 2009)

Virus: Microorganismos formados de proteínas y ácido nucleico (ADN o ARN), los virus del agua en su mayoría son entéricos excretados por las heces y que sobreviven en el ambiente por un tiempo largo como por ejemplo los fagos (colifagos somáticos y colifagos específicos) presentes en el agua residual y contaminada. (Pullés, 2014, pp.28-29) (Arcos, 2005, p.74-75)

Entre otros organismos considerados importantes para determinar la calidad del agua tenemos:

Parásitos: Son patógenos para el ser humano, se dividen en dos grupos, el uno grupo formado por los protozoos los cuales en su ciclo de vida presentan una forma vegetativa (trofozoito) y una resistente (quiste), de estos los más frecuentes en las heces humanas son *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* y *Balantidium coli*. (Pullés, 2014, p.29) (Arcos, 2005, p.75)

El otro grupo de parásitos corresponden a los helmintos (nematodos, tremátodos y cestodos), los cuales no se reproducen fuera del huésped pero permanecen en el suelo durante un largo tiempo, pueden generar enfermedades como la teniasis ocasionada por la *Taenia solium* o *Taenia saginata*, triquinosis producida por la *Trichinella spiralis*, ascaridiosis producida por el *Ascaris lumbricoides*, entre otras. (Arcos, 2005, p.75-76)

1.5.3 Legislación

Los textos legales que sirven de base en el control de la calidad de las aguas termales son pocos, en España una referencia legal es el Real Decreto Ley de 25 de abril de 1928 en el cual consta el Estatuto de la explotación de manantiales de aguas minero-medicinales cuyo artículo 66 menciona que los manantiales termales cada 10 años deben ser inspeccionados, analizados y determinado su caudal. (Rodés, 2001, pp.82-83)

Entre otras leyes tenemos la de Cantabria 2/1988 y el Decreto 28/1990 del Gobierno Cántabro que aprueban el Fomento, Ordenación y Aprovechamiento de los Balnearios y Aguas termales, el Decreto 262/1990 del Diario Oficial de Catalunya en el que se establecen los requisitos técnico sanitarios que deben cumplir los balnearios. (San Martín, 2002) (Rodés, 2001, pp.82-83)

Ley 8/1990 de Aguas Minerales y termales de Castilla, Ley 5/1995 de regulación de las aguas minerales, termales de manantial y de los balnearios de la Comunidad Autónoma de Galicia, Norma Chilena Oficial 2939 Termas-Requisitos para su clasificación, el decreto 106 del año 2001 sobre el reglamento de aguas minerales. (Rodés, 2001, pp.82-83)

Norma ambiental sobre la calidad de aguas subterráneas y descargas al subsuelo del año 2004 de República Dominicana, Reglamento sobre normas de exploración y explotación de aguas subterráneas del año 2013 del Gobierno de Chile, entre otros. (Rodés, 2001, pp.82-83)

En nuestro país el Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología (INAMHI) proporciona información acerca del tiempo, clima y recursos hídricos del país a fin de cuidar el medio ambiente, disminuir peligros naturales y colaborar en el desarrollo sostenible del país.

En Ecuador disponemos de las siguientes normas:

- NTE INEN 1882:2012 Agua. Definiciones en donde se dan los conceptos de agua mineral natural y de agua subterránea.
- NTE INEN 2178:2011 Aguas minerales. Aguas minerales naturales. Requisitos.
- NTE INEN 2169: 1998 Agua. Calidad del agua. Muestreo. Manejo y conservación de muestras.
- NTE INEN 2176: 1998 Agua. Calidad del agua. Muestreo. Técnicas de muestreo
- NTE INEN 2226: 2000 Agua. Calidad del agua. Muestreo. Diseño de los programas de muestreo.

1.6 Microbiología

Es la ciencia que estudia los microorganismos de tamaño muy pequeño para ser visible al ojo humano, en cuanto a su forma, estructura, fisiología, genética, reproducción, metabolismo e identificación, además de aspectos que tienen relación con la interacción con el hombre entre las cuales se encuentra la capacidad de originar enfermedades o algún uso biotecnológico, la palabra microbiología viene del griego *micro* que significa pequeño, *bios* vida y *logia* estudio. (Madigan, 2004, p.1) (Prescott, 2004, p.2)

1.6.1 Microorganismo

Un microorganismo es un organismo vivo que a simple vista no es visible, los microorganismos se dividen en dos categorías los procariotas (archeas y bacterias) y los eucariotas (hongos, algas y protozoarios), los virus también son considerados como microorganismos. (Madigan, 2004, p.1)

Los microorganismos son los seres más abundantes en la tierra, que pueden vivir en condiciones extremas de pH, temperatura, oxígeno, en una gran variedad de nichos ecológicos. (Montaño, 2010)

1.6.1.1 Bacterias

Microorganismos unicelulares procariotas, no poseen núcleo definido ni orgánulos internos pero si una pared celular constituida de peptidoglicano, muchas de ellas tienen flagelos u otros sistemas de desplazamiento por lo cual son móviles; se reproducen por bipartición y se encuentran en todos los hábitats tanto terrestres como acuáticos. Las bacterias tienen un tamaño de entre 0.5 a 3µm pudiendo llegar hasta 10µm ciertos tipos, las de interés médico miden de 0.4 a 2µm. (Winn, 2006, p.3)

1.6.1.1.1 Morfología bacteriana

Las formas que presentan las bacterias dependen de la rigidez de la pared celular, al microscopio se pueden observar las siguientes:

Cocos: Proviene del griego *kókkos* que significa grano, bacterias de forma redondeada, esférica u ovalada, pueden aparecer aislados, en grupos de dos denominados diplococos, en grupos de cuatro tetracoco, en cadenas estreptococos, en forma de racimos o estafilococos, en masas cúbicas o sarcinas. Su relación superficie/volumen es pequeña, son muy resistentes, su transmisión se realiza por el aire, por ejemplo los géneros *Streptococcus*, *Staphylococcus*, etc. (Madigan, 2004, p.64)

Luego de la división celular las bacterias pueden permanecer unidas preservando su independencia celular, si el plano de división es uno se presentan diplococos o cocos en cadena del género *Streptococcus*, si existen varios planos de división los cocos se agrupan en tétradas o racimos como en el caso del género *Staphylococcus* como se muestra en la figura 6-1 A. (Sánchez, 2005)

Bacilos: Proviene del latín *baculus* que significa varilla, son bacterias con forma alargada y cilíndrica a manera de bastoncillo, pueden aparecer en cadenas lineales o ramificadas como se indica en la figura 6-1 B. (Madigan, 2004, p.64) (Sánchez, 2005)

Su relación superficie/volumen es superior a la de los cocos, pueden adaptarse y vivir en lugares con escasos nutrientes, son menos resistentes, aptos a los cambios ambientales, se transmiten mediante superficies húmedas o líquidos por ejemplo los géneros *Bacillus*, *Clostridium*. (Sánchez, 2005)

Por otro lado los bacilos pueden ser cortos denominados cocobacilos, largos, con extremos redondos o rectos, pueden disponerse de manera aislada, en cadenas, filamentos o como letras chinas en el caso del género *Corynebacterium*. (Sánchez, 2005)

Espirilos: Presentan una forma espiral o de hélice como se muestra en la figura 6-1 C, los espirales se mueven en tornillo a través de los medios viscosos, son de pequeño diámetro, pueden atravesar las mucosas, sensibles a las condiciones ambientales, si son bacterias patógenas se transmiten vía sexual o por vectores como artrópodos y hematófagos. (Madigan, 2004, p.64) (Sánchez, 2005)

Vibrios: Bacterias con forma de coma, cortas y curvadas por ejemplo el *Vibrio cholerae*. (Figura 6-1 C) (Sánchez, 2005)

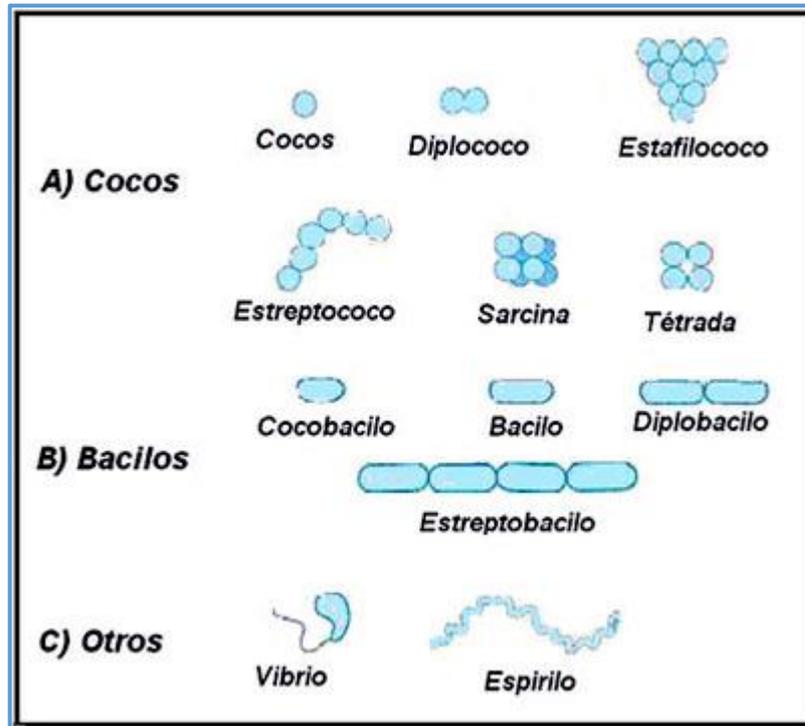


Figura 6-1: Morfología de las bacterias

Fuente: MOLINA, 2015

1.6.2 *Microbiología del agua*

La microbiología del agua ha permitido conocer cuáles son los microorganismos que habitan en ella, si son o no patógenos, las condiciones favorables para su crecimiento y los ciclos de vida de los mismos. (Morales, 2010, p.2)

El agua es un vector primordial en el ciclo de vida de varios microorganismos, por tanto se debe realizar un control rutinario pues va hacer usada por los seres humanos y debe estar libre de bacterias patógenas. (Morales, 2010, p.2)

1.6.3 *Microbiota de las aguas termales*

Las aguas termales al ser ambientes de condiciones extremas contienen una variedad de microbios entre los cuales tenemos los autóctonos propios de estas aguas y de sus características

fisicoquímicas como la temperatura, pH, componentes minerales, entre otras, principalmente destacan las bacterias oligotróficas de los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Enterobacter*, *Acinetobacter* y *Arthrobacter*. (De La Rosa y Mosso, 2000, p.153)

El otro grupo lo conforman los microorganismos alóctonos los cuales provienen de otros ambientes como suelo, aguas residuales, vegetación, heces fecales, entre otros, la mayoría pertenecen a los géneros *Salmonella* y *Legionella*, y a las especies *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Pseudomonas aeruginosa* los cuales se pueden adaptar y vivir en las aguas termales. (De La Rosa y Mosso, 2000, p.153-154)

Cabe mencionar también que en las aguas termales es rara la presencia de indicadores fecales y bacterias patógenas, en los manantiales hipertermales preponderan los microorganismos Gram positivos en cambio en los manantiales mesotermos preponderan los bacilos Gram negativos y los cocos Gram positivos cuya diferencia se debe a que las bacterias Gram positivas resisten más al calor. (De La Rosa y Mosso, 2000, p.153)

En estudios ecológicos de la microbiota de las aguas termales se han encontrado diferentes comunidades bacterianas en varios manantiales calientes, las cuales se trataban de bacterias termófilas que pueden ser aplicadas en el campo de la biotecnología ya que sus enzimas son resistentes al calor. (De La Rosa y Mosso, 2000, p.154-155)

En las aguas termales alcalinas se pueden encontrar bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Exiguobacterium*, en cambio en termas de pH ácido se encuentran bacilos Gram positivos irregulares. (De La Rosa y Mosso, 2000, p.157)

1.6.3.1 Microorganismos autóctonos

Los microorganismos autóctonos de las aguas termales se desarrollan mejor en medios de cultivo con pocas cantidades de carbono y después de un tiempo largo de incubación, algunas bacterias son termófilas por lo que se desarrollan a una temperatura superior a 45°C pero la mayoría son mesófilas las cuales se desarrollan a 37°C y se han adaptado a crecer en temperaturas elevadas. (De La Rosa y Mosso, 2000, p.155)

Las arqueobacterias (arqueas) son extremófilas se encuentran distribuidas en el ambiente tanto en ambientes hostiles como las aguas termales, el suelo, océanos, pantanos y colon humano;

pertenecen al dominio *Archaea*, son microorganismos unicelulares, no poseen núcleo ni organelos membranosos internos, son similares a las bacterias en tamaño y forma sin embargo algunas tienen formas inusuales, sus grupos más reconocidos son los *Crenarchaeota* y *Euryarchaeota*. (Madigan, 2004, p.32) (Sánchez, 2005)

De acuerdo a sus requerimientos nutricionales predominan los microorganismos heterótrofos oligotróficos, seguido de las bacterias autótrofas tanto quimiolitotrofas como fototrofas, en cuanto al requerimiento de oxígeno la mayoría de bacterias son aerobias o anaerobias facultativas, de tamaño pequeño, móviles y con pigmentos. (De La Rosa y Mosso, 2000, p.155)

Los microorganismos según su fuente de carbono o desde el punto de vista biosintético son heterótrofos obtienen el carbono y la energía de compuestos orgánicos como la glucosa para construir su masa celular y los autótrofos que se desarrollan sintetizando sus materiales a partir de compuestos inorgánicos es decir obtienen el carbono del dióxido de carbono. (Félez, 2009)

Según su fuente de energía los microorganismos pueden ser quimiotrofos obtienen su energía para vivir y crecer de compuestos químicos externos que se oxidan y los fototrofos obtienen energía de la luz. (Félez, 2009)

Por otro lado desde los fines de aprovisionamiento de energía los microorganismos litotrofos obtienen los equivalentes reductores para conservar energía o para las reacciones biosintéticas de los compuestos inorgánicos sencillos. (SH_2 , SO , NH_3 , Fe , etc) (Félez, 2009)

Por tanto los microorganismos quimiolitótrofos para obtener su energía oxidan los compuestos inorgánicos y los microorganismos oligotróficos son los que requieren poca cantidad de nutrientes como carbono y nitrógeno. (Félez, 2009)

Entre los principales géneros que han sido detectados en las termas se encuentran *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Enterobacter*, *Acinetobacter* y *Arthrobacter*. En los manantiales meso e hipotermas podemos encontrar *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas putida*, en aguas termales de baja temperatura además se puede encontrar bacilos Gram negativos como *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Vibrio*, *Aeromonas*. (De La Rosa y Mosso, 2000, p.156)

Las bacterias del género *Bacillus* se encuentran ampliamente distribuidas y pueden provenir del suelo, las cuales se han adaptado a vivir en las aguas termales; por otro lado los cocos Gram positivos de los géneros *Staphylococcus* y *Micrococcus* resisten elevadas concentraciones de sal. (De La Rosa y Mosso, 2000, p.156)

Entre otros género de cocos se encuentran *Vagococcus*, *Planococcus* y *Marinococcus* de ambientes acuáticos dulces y marinos, el género *Enterobacter* por encontrarse distribuido en la naturaleza se lo considera autóctono. (De La Rosa y Mosso, 2000, p.156)

En aguas termales sulfurosas habitan microbios que oxidan el azufre y el ácido sulfhídrico como *Beggiatoa*, *Thermothrix*, *Thiobacillus* y microorganismos sulfatorreductores como *Desulfotomaculum*, *Desulfovibrio*. En las aguas termales ferruginosas podemos encontrar microorganismos que oxidan el ión ferroso a férrico como *Clonothrix*, *Leptothrix*, *Leucothrix*, *Sphaerotilus*. (De La Rosa y Mosso, 2000, pp.155-156)

En aguas termales con cloruro de sodio e hipertónicas se encuentran bacterias halófilas moderadas como *Halomonas*, *Micrococcus*, *Vibrio* y halotolerantes como *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Planococcus* que resisten una elevada osmolaridad. (De La Rosa y Mosso, 2000, p.156)

En aguas hipertermales podemos encontrar bacilos Gram positivos como *Arthobacter*, *Kurthia*, *Corynebacterium*, *Cellulomonas*, *Exiguobacterium*, *Rubrobacter* provenientes del suelo que se han adaptado a desarrollarse en extremas condiciones. (De La Rosa y Mosso, 2000, p.156)

1.6.3.2 *Microorganismos alóctonos*

Los microorganismos alóctonos no son comunes en las aguas termales, como se mencionó anteriormente provienen del suelo, vegetales, aguas residuales, heces fecales. (De La Rosa y Mosso, 2000, p.154)

En las aguas termales no debe existir microbios patógenos ni indicadores fecales a pesar de ello se ha identificado coliformes, enterococos, *Clostridium* sulfito reductores y *Pseudomonas aeruginosa*, el indicador de contaminación fecal primordial es el microorganismo *Escherichia coli*. (De La Rosa y Mosso, 2000, p.156-157)

Los coliformes no fecales pueden provenir del suelo o de los vegetales y se desarrollan en el agua formando biofilms, el microorganismo patógeno *Pseudomonas aeruginosa* puede generar infecciones en personas inmunodeprimidas esta bacteria puede encontrarse en aguas subterráneas que no han sido contaminadas por el hombre, su presencia indica que el manantial termal tiene una escasa protección. (De La Rosa y Mosso, 2000, pp.156-157)

Además se han encontrado mohos de géneros como *Penicillium*, *Aspergillus* y *Alternaria*, que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, en bajas cantidades no perturban la calidad sanitaria de las termas. (De La Rosa y Mosso, 2000, p.157)

1.7 Medios de cultivo

Los medios de cultivo son un conjunto de sustratos o soluciones nutritivas, factores de crecimiento y otros componentes que permiten el crecimiento de los microorganismos que en ellos se siembran luego de transcurridos al menos de 18 a 24 horas para visualizarlas. (Madigan, 2004, p.107) (López y Torres, 2006)

Entre los constituyentes frecuentes de un medio de cultivo se encuentran:

- Agar agente gelificante, permite solidificar los medios de cultivo, el agar está compuesto principalmente de un polisacárido obtenido de algas marinas rojas el cual no es utilizado por los microorganismos como nutriente, su concentración en medios de cultivo sólidos es de 13-20g/L y de 5-7g/L en medios semisólidos. El agar se licúa a 100°C y se solidifica a 40°C. (Casado, 2012, p.3) (Pascual, 2012)
- Extractos originados a partir de determinados órganos o tejidos animales o vegetales que son extraídos con agua y calor y luego concentrados hasta que estos formen una pasta o un polvo, los que se utilizan comúnmente son el extracto de carne, de levadura y de malta. (Pascual, 2012)
- Peptonas ricas en péptidos y aminoácidos de pequeño peso molecular, son mezclas de compuestos orgánicos nitrogenados obtenidos a partir de la digestión enzimática o química de proteínas que pueden ser animales y vegetales (carne, gelatina, caseína, soja) y sales minerales, las más utilizada es la Peptona de Caseína. (Pascual, 2012)
- Fluidos corporales aportan factores de crecimiento a las bacterias los cuales se deben añadir al medio de cultivo después de que este haya sido autoclavado, permite realizar el primer aislamiento del microorganismo a partir del hospedador, por ejemplo la sangre completa, sangre desfibrinada, el plasma o el suero sanguíneo. (Pascual, 2012)

- Sistemas amortiguadores que permiten mantener el pH en un rango adecuado para que el microorganismo pueda crecer, entre estos tenemos los fosfatos bisódicos o bipotásicos que evitan una desviación del pH. (Pascual, 2012)
- Indicadores de pH que permitan determinar cuando este varíe debido a fermentaciones u otros procesos como por ejemplo el rojo fenol que es rojo en pH básico y amarillo en pH ácido. (Casado, 2012, p.4) (Pascual, 2012)
- Agentes reductores permiten crear en el medio de cultivo las condiciones adecuadas para el crecimiento de microorganismos anaerobios o microaerófilos, los más utilizados son la cisteína y el tioglicolato. (Pascual, 2012)
- Agentes selectivos que son componentes fundamentales de los medios de cultivo selectivos, entre estos tenemos el cristal violeta, sales biliares, azida sódica, telurito potásico, antibióticos, etc. (Pascual, 2012)

1.7.1 Clasificación de los medios de cultivo

Los medios de cultivo se clasifican de acuerdo a varios criterios de la siguiente manera.

- Por su composición pueden ser:

Medios naturales o complejos preparados a partir de sustancias de origen animal o vegetal como extractos de tejido o infusiones, su composición no está definida de manera exacta por ejemplo el extracto de carne o de levadura. (Granados y Villaverde, 2003: p.11) (López y Torres, 2006) (Casado, 2012, p.12)

Medios sintéticos con una composición química definida, las sustancias son disueltas en agua destilada en cantidades determinadas. (Granados y Villaverde, 2003: p.11) (López y Torres, 2006) (Casado, 2012, p.12)

Medios semisintéticos que son los mismos medios sintéticos a los que se les han agregado factores de crecimiento es decir un extracto orgánico complejo como el extracto de levadura. (Granados y Villaverde, 2003: p.11) (López y Torres, 2006) (Casado, 2012, p.12-13)

- Por su consistencia o estado físico pueden ser:

Medios líquidos dentro de los que se incluyen los caldos, los nutrientes están disueltos en el agua, permiten conseguir suspensiones con una gran cantidad de microorganismos por ejemplo el caldo nutritivo. (Granados y Villaverde, 2003: p.9) (López y Torres, 2006)

Medios sólidos preparados en base al agar extraído de las algas o cualquier otro agente solidificante y un medio líquido como un caldo en una cantidad de 15 gramos de agar por litro de caldo; esterilizado y vertido en placas de Petri o en tubos de ensayo permiten aislar bacterias, estudiar la morfología de las colonias y mantener los microorganismos en el laboratorio. Un ejemplo de los medios de cultivo sólidos es el agar Sangre en el cual luego de sembrar por agotamiento una bacteria se pueden observar las colonias aisladas y ver sus características macroscópicas. (Granados y Villaverde, 2003: p.9) (López y Torres, 2006)

Medios semisólidos que se preparan a partir de medios líquidos y un agente solidificante, contienen 7,5 g de agar por litro de caldo y permite identificar la motilidad de los microorganismos. (López y Torres, 2006)

- Por su utilización se clasifican en:

Medios comunes o universales que son de uso frecuente y permiten mantener las colonias microbianas que no necesitan requerimientos especiales, por ejemplo el agar nutritivo. (López y Torres, 2006) (Casado, 2012, p.10)

Medios selectivos que pueden ser sólidos o líquidos, su selectividad se logra modificando las condiciones físicas del medio, agregando o eliminando sustancias químicas específicas, es así que estos medios de cultivo contienen elevadas concentraciones de cloruro sódico, cristal violeta, sales biliares, antibióticos que solamente permiten el desarrollo de determinados microorganismos inhibiendo a otros, por ejemplo el agar manitol salado que permite el crecimiento de ciertos estafilococos. (Granados y Villaverde, 2003: p.10) (López y Torres, 2006) (Casado, 2012, p.10)

Medios de enriquecimiento líquidos, permiten inhibir las especies que no nos interesan y favorecer el crecimiento del microorganismo deseado, además de los nutrientes que poseen requiere de factores indispensables en el crecimiento de gérmenes exigentes, por ejemplo el caldo tetrationato utilizado en el enriquecimiento de cepas del género *Salmonella*. (Winn, 2006, p.215) (Granados y Villaverde, 2003: p.10) (López y Torres, 2006) (Casado, 2012, p.10)

Medios diferenciales que permiten poner de manifiesto características bioquímicas de los microorganismos que nos ayuden a identificarlos en cuanto al género o especie, para lo cual requieren de un azúcar fermentable o sustrato metabolizable, por ejemplo el agar MacConkey que permite distinguir microorganismos que fermentan la lactosa de los que no lo hacen. (Granados y Villaverde, 2003: p.10) (López y Torres, 2006) (Casado, 2012, pp.10-11)

Medios de identificación que permiten comprobar las cualidades específicas de los microorganismos a fin de reconocerlos e identificarlos, por ejemplo el agar Simmons Citrato que determina si el microorganismo es capaz de usar para su metabolismo solo el citrato como fuente de carbono y compuestos amoniacales como fuente de nitrógeno en cuyo caso el medio toma un color azul, esto ocurre por ejemplo en los microorganismos del género *Enterobacter*. (Granados y Villaverde, 2003: p.10) (Casado, 2012, p.11)

Medios de multiplicación suelen ser medios líquidos, sirven para replicar una célula a partir del aislado, son utilizados para fabricar vacunas, en investigaciones o con fines industriales, ejemplo de estos son el caldo infusión cerebro-corazón. (Casado, 2012, p.11)

Medios de transporte que se emplean para garantizar la viabilidad de los microorganismos sin que estos se reproduzcan significativamente desde su extracción hasta cuando vayan a ser estudiados, es recomendable que exista un límite de 2 horas entre la recolección de la muestra y su estudio sin embargo este límite es superable si se emplea el medio adecuado. Los medios más utilizados son Stuart y Cary-Blair. (López y Torres, 2006) (Casado, 2012, p.11)

Medios de cultivo mixto que combinan varias características como por ejemplo el agar *Salmonella Shigella* que es selectivo gracias al indicador verde brillante y también es un medio diferencial debido a que contiene lactosa y un indicador que diferencia las bacterias fermentadoras de lactosa de las que no lo son. (Casado, 2012, p.12)

Dentro de algunos de los medios de cultivo usados en estudios microbiológicos tenemos:

- **Agar sangre** es un medio de cultivo de aislamiento que permite el crecimiento de cualquier especie de microorganismo, durante su preparación se debe añadir un 5% de sangre desfibrinada. (Granados y Villaverde, 2003: p.26) (Casado, 2012, pp.14-15)

También permite determinar la capacidad hemolítica de un microorganismo mediante la observación de la presencia o ausencia de halos de hemólisis alrededor de las colonias, pudiendo de esta manera identificarse tres tipos de hemólisis que son alfa, beta o gamma cuyas características se presentan en la tabla 6-1. (Laboratorios Britania S.A., 2015e)

Tabla 6-1: Tipos de hemólisis

TIPO DE HEMÓLISIS	CARACTERÍSTICAS
Beta	Lisis completa de los eritrocitos, alrededor de la colonia se forma un halo transparente, por ejemplo <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> .
Alfa	Lisis parcial de los eritrocitos, los poros en la membrana se abren, sale la hemoglobina al medio de cultivo, se oxida el grupo hemo, se produce biliverdina, alrededor de la colonia se forma un halo verdoso, por ejemplo <i>S. pneumoniae</i> , estreptococos del grupo viridans.
Gamma	Ausencia de halo de hemólisis

Fuente: LABORATORIOS BRITANIA S.A., 2015e

A continuación se presenta la figura 7-1 que diferencia los patrones de hemólisis.

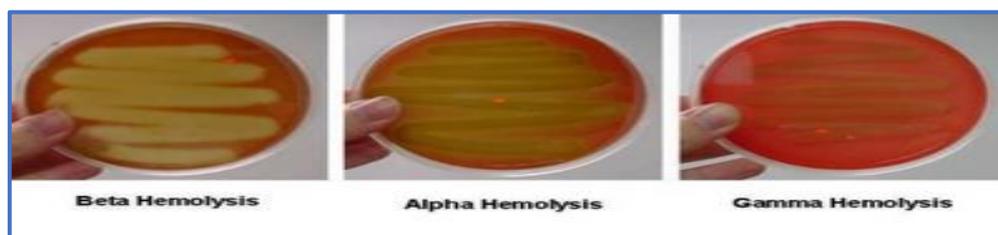


Figura 7-1: Patrones de hemólisis

Fuente: ARANGUREN, 2014

- **Agar manitol salado** es un medio diferencial y selectivo para el aislamiento de bacterias Gram positivas del género *Staphylococcus*, gracias a su elevado contenido de cloruro sódico (7.5%) inhibe de forma total o parcial el desarrollo de microorganismos de otros géneros, el manitol es el carbohidrato fermentable, su indicador de pH es el rojo fenol que evidencia la fermentación del manitol por el cambio de color del medio a amarillo. (Casado, 2012, p.23) (Laboratorios Britania S.A., 2015c) (Becton Dickinson, 2013b)

Los microorganismos que se desarrollan en presencia de elevadas cantidades de sal y fermentan el manitol generan ácidos que modifican el pH del agar virando el indicador de pH del color rojo al amarillo. (Laboratorios Britania S.A., 2015c) (Becton Dickinson, 2013b)

Este medio permite establecer una relación entre la patogenicidad del microorganismo y su capacidad fermentadora, es así que los estafilococos patógenos fermentan manitol generando colonias de color amarillo mientras que los que no son patógenos no fermentan manitol y originan colonias rosadas. (Laboratorios Britania S.A., 2015c)

La fermentación del manitol permite además la diferenciación de los estafilococos coagulasa positivo que generan colonias amarillas rodeadas de una zona amarilla, de los estafilococos coagulasa negativos que originan colonias rojas con una zona alrededor de color roja o púrpura como se indica en la figura 8-1. (Casado, 2012, p.23) (Laboratorios Britania S.A., 2015c) (Becton Dickinson, 2013b)

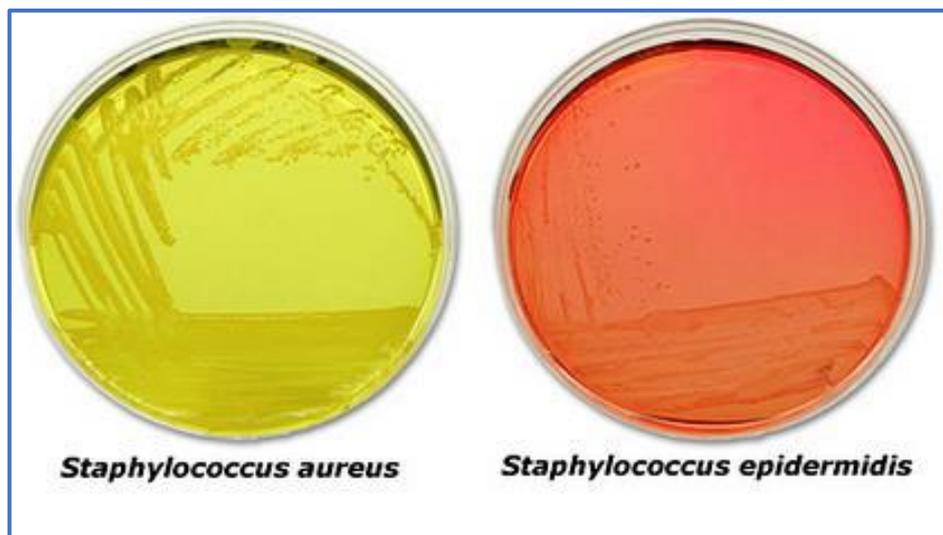


Figura 8-1: Fermentación del manitol (lado izquierdo) y ausencia de fermentación del manitol (lado derecho).

Fuente: ARAVANLABS, 2015

- **Agar eosina, azul de metileno (E.M.B.)** es un medio diferencial y selectivo de bacilos entéricos Gram negativos de crecimiento rápido pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, sus colorantes eosina y azul de metileno inhiben de manera parcial el crecimiento de microorganismos Gram positivos y negativos exigentes. (Laboratorios Britania S.A., 2010a) (Becton Dickinson, 2013a)

Su contenido en lactosa permite determinar si el microorganismo es o no fermentador de esta, los microorganismos que si lo hacen generan colonias con centro oscuro y periferia de color azulado a rosado, la *Escherichia coli* origina colonias verdosas con brillo metálico. (Laboratorios Britania S.A., 2010a)

Los microorganismos que producen ácido de manera débil originan colonias violeta y los que no fermentan lactosa colonias incoloras o de color ámbar translúcido como en el caso del género *Salmonella*, *Proteus*, *Pseudomonas* y *Shigella* como se indica en la figura 9-1. Los *Enterococcus faecalis* son parcialmente inhibidos. (Laboratorios Britania S.A., 2010a)



Figura 9-1: Fermentación de lactosa (lado izquierdo) y ausencia de fermentación de lactosa (lado derecho)

Fuente: DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO, 2010

Para identificar los microorganismos utilizando el agar eosina azul de metileno debemos tomar en cuenta los aspectos de crecimiento mencionados en la tabla 7-1.

Tabla 7-1: Aspectos de crecimiento de algunas enterobacterias en agar eosina azul de metileno.

MICROORGANISMO	ASPECTO DE CRECIMIENTO
<i>Escherichia coli</i>	Colonias grandes, negro azulado con brillo metálico verde
<i>Enterobacter/Klebsiella</i>	Colonias grandes negro azuladas mucoides
<i>Proteus</i>	Colonias grandes incoloras
<i>Enterococcus faecalis</i>	Colonias incoloras, puntiformes y pequeñas
<i>Salmonella /Shigella</i>	Colonias grandes, incoloras o ámbar
<i>Pseudomonas</i>	Colonias incoloras irregulares
Bacterias Gram positivas	No existe crecimiento o es escaso

Fuente: LABORATORIOS BRITANIA S.A., 2010; BECTON DICKINSON, 2013

- **Agar Mueller-Hinton** es un medio de cultivo utilizado para realizar ensayos de sensibilidad y pruebas de susceptibilidad de los microorganismos frente a los medicamentos, como el ensayo de difusión en placa. Si a este medio se le agrega sangre de cordero al 5% se lo puede utilizar para efectuar pruebas de sensibilidad a los antibióticos en especies de estreptococos. (Granados y Villaverde, 2003: p.25) (Casado, 2012, pp.21-22)
- **Agar MacConkey** es un medio diferencial y selectivo para enterobacterias y bacilos Gram negativos entéricos, aerobios y anaerobios facultativos, las sales biliares y el cristal violeta que contiene inhiben el crecimiento de microorganismos Gram positivos y de algunos Gram negativos que son exigentes. (Winn, 2006, p.212) (Laboratorios Britania S.A., 2015b)

Además el agar MacConkey contiene el indicador rojo neutro y lactosa, los microorganismos que fermentan lactosa originan colonias de tono rojizo y pueden tener una zona que les rodea de bilis precipitada, los que son fuertes fermentadores de lactosa producen ácidos que dan lugar a que las colonias estén rodeadas por zonas opacas. (Winn, 2006, p.214) (Laboratorios Britania S.A., 2015b)

Si los microorganismos no fermentan lactosa las colonias serán incoloras o transparentes como las de *S. typhi*, *S. paratyphi* y *S. disenteriae*, todos estos aspectos de crecimiento se encuentran indicados en la tabla 8-1 y en la figura 10-1. (Laboratorios Britania S.A., 2015)

Tabla 8-1: Aspectos de crecimiento de algunos microorganismos en agar MacConkey.

MICROORGANISMO	ASPECTO DE CRECIMIENTO
<i>Escherichia coli</i>	Colonias de rosa a rojo pueden presentar una zona de precipitación de bilis.
<i>Enterobacter, Klebsiella</i>	Colonias rosa mucoides
<i>Proteus</i>	Colonias incoloras
<i>Salmonella, Shigella</i>	Colonias incoloras, el medio se vuelve de anaranjado a ámbar
<i>Pseudomonas</i>	Colonias de incoloras a color rosa
<i>Salmonella typhimurium</i> / <i>Salmonella abony</i>	Colonias de incoloras a beige
<i>Shigella flexneri</i>	Colonias incoloras
<i>Enterococcus faecalis</i>	Colonias incoloras, opacas y diminutas

Fuente: BECTON DICKINSON, 2014



Figura 10-1: Aspectos de crecimiento de algunos microorganismos en agar MacConkey (lado izquierdo) y diferenciación de la fermentación de lactosa en el medio (lado derecho).

Fuente: ONLINE MICROBIOLOGÍA NOTES, 2015

- **Agar Salmonella Shigella (Agar SS)** es un medio de cultivo selectivo y diferencial para la *Salmonella spp.* y algunas especies de *Shigella spp.* está compuesto por sales biliares, citrato sódico y férrico, tiosulfato y un colorante que es el verde brillante que inhibe el crecimiento de una gran cantidad de bacterias Gram positivas, coliformes y *Proteus spp.* (Granados y Villaverde, 2003: p.27) (Casado, 2012, pp.16-18)

El tiosulfato de sodio permite que se forme SH_2 que se evidencia por que se forma sulfuro de hierro y las colonias son de color negro. Este medio contiene lactosa, los microorganismos que la fermentan originan colonias de color rosado o rojo y las que no la fermentan originan colonias transparentes (*Shigella*), en el caso de la *Salmonella* sus colonias son transparentes con centro negro que indica producción de H_2S . (Laboratorios Britania S.A., 2015d)

Para identificar los microorganismos utilizando el agar *Salmonella Shigella* debemos tomar en cuenta los aspectos de crecimiento citados en la tabla 9-1 y en la figura 11-1.

Tabla 9-1: Aspectos de crecimiento de algunos microorganismos en agar *Salmonella-Shigella*.

MICROORGANISMO	ASPECTO DE CRECIMIENTO
<i>Salmonella typhimurium</i>	Colonias transparentes con centro blanco
<i>Enterococcus faecalis</i>	Colonias incoloras de escaso crecimiento
<i>Escherichia coli</i>	Ligero crecimiento, colonias color rosa o rojo
<i>Enterobacter/Klebsiella</i>	Leve crecimiento, colonias color rosadas cremosas, mucosas
<i>Proteus mirabilis</i>	Colonias incoloras con centros negro
<i>Salmonella</i>	Colonias incoloras con centro negro
<i>Shigella</i>	Colonias incoloras
<i>Pseudomonas</i>	Leve crecimiento
Bacterias Gram positivas	No existe crecimiento

Fuente: Becton Dickinson, 2013c



Figura 11-1: Aspectos de crecimiento de algunos microorganismos en agar *Salmonella-Shigella*.

Fuente: CASADO, 2012

- **Agar Nutritivo** se usa para cultivar una gran diversidad de microorganismos, contiene extracto de carne y peptona como fuentes de nitrógeno, vitaminas y carbono. En este estudio microbiológico fue empleado como base para la preparación de los agares para la hidrólisis de la gelatina y del almidón. (Granados y Villaverde, 2003: pp.25-26) (Casado, 2012, p.13)
- **Caldo tripticasa de soja** es un medio de cultivo que permite el crecimiento de microbios exigentes, la tripteína y peptona de soja aportan nutrientes como péptidos, minerales y vitaminas, la fuente de energía es la glucosa, el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico. Si se le añade 6.5% de cloruro de sodio permite el desarrollo selectivo de estreptococos del grupo D. (Laboratorios Britania S.A., 2011)

1.7.2 Placas 3M Petrifilms

Método microbiológico que emplea placas listas para usarse, constituye un soporte físico formado de un film superior de plástico recubierto de un adhesivo, un indicador y el gel soluble en frío y un film inferior de papel cuadriculado cubierto por un plástico, un medio de cultivo estándar y un gel soluble en frío. (3M España S.A., 2013) (3M España S.A., 2010)

Capa Petrifilm tiene una película deshidratada de medio de cultivo cubierta de nutrientes, un agente gelificante soluble en agua e indicadores, los cuales son indispensables para el crecimiento microbiano, en estos se coloca 1mL de muestra la cual rehidrata al medio, luego de la incubación se puede hacer el recuento de microorganismos. (3M España S.A., 2013) (3M España S.A., 2010)



Figura 12-1: Placas 3M Petrifilms

Fuente: 3M ESPAÑA S.A., 2016

Existen varios tipos de placas Petrifilms (Figura 12-1) dentro de las cuales tenemos:

La placa Petrifilm para el recuento rápido de aerobios que es un soporte físico donde se coloca un medio de cultivo que contiene nutrientes, un agente gelificante soluble en agua fría y un indicador de color rojo y azul para el conteo de colonias. (3M México, 2004)

La placa Petrifilm de *Escherichia coli* y Coliformes contiene nutrientes del agar Violeta Rojo Bilis (VRB) que es selectivo para los coliformes, un agente soluble en agua fría, un indicador de la actividad glucoronidasa BCIG (5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-glucurónido) y un indicador de tetrazolio, además la película superior permite atrapar el gas originado por los Coliformes y *Escherichia coli* debido a la fermentación de la lactosa. (3M, 2006a) (3M México, 2006)

La placa Petrifilm de *Staphylococcus aureus* contiene el medio de cultivo de Baird Parker modificado, el cual es selectivo y diferencial para *Staphylococcus aureus* que se presentan en forma de colonias rojo-violeta, el disco Petrifilm Staph Express permite detectar la reacción de desoxirribonucleasa (DNasa) cuya visualización es mayor gracias a que contiene azul-O toluidina. (3M España S.A., 2002)

La placa Petrifilm de mohos y levaduras, es un medio de cultivo que posee nutrientes del medio Sabhi con antibióticos (clorotetraciclina y cloranfenicol) que impiden el crecimiento de los microorganismos que no nos interesan, un indicador de fosfatos (BCIP), un agente gelificante soluble en agua fría y un indicador de color que permite el recuento de las colonias. (López y Torres, 2006) (3M, 2006b)

1.8 Cultivo de microorganismos

Es el proceso de inocular el medio de cultivo con microorganismos e incubarlo en condiciones que favorezcan el crecimiento microbiano. (Madigan, 2004, p.108)

El cultivo de microorganismos requiere de conocimientos sobre la siembra o inoculación y aislamiento de los mismos, radica en proporcionarles adecuadas condiciones físicas, químicas y nutritivas para que puedan reproducirse. (Madigan, 2004, p.108) (Pisabarro, 2005)

Una forma de identificar los microorganismos es observando su crecimiento en medios de cultivo preparados en el laboratorio. (Madigan, 2004, p.108) (Pisabarro, 2005)

1.8.1 *Requisitos de crecimiento microbiano*

Para que una bacteria crezca a más de cumplir con sus requisitos nutricionales, debemos garantizar cumplir con sus requerimientos atmosféricos, pH, humedad y de temperatura óptimos. Un medio de cultivo debe contener carbono, nitrógeno, azufre, fósforo, sales inorgánicas en algunas ocasiones vitaminas y otras sustancias inductoras de crecimiento microbiano. (Granados y Villaverde, 2003: pp.6-8) (Fernández, 2010, p.5)

Una clasificación de las bacterias basada en los requerimientos atmosféricos se muestra en la tabla 10-1.

Tabla 10-1: Clasificación de las bacterias según su requerimiento atmosférico

CLASIFICACIÓN	REQUERIMIENTO ATMOSFÉRICO
Aerobias estrictas	Crece en presencia de oxígeno
Anaerobias estrictas	Crece en ausencia de oxígeno
Facultativas	Crece en ausencia o presencia de oxígeno
Microaerofílicas	Crece en una atmósfera reducida de oxígeno
Capnofílicas	Crece en presencia de CO ₂

Fuente: MADIGAN, 2004; WINN, 2006; Fernández, 2010

La mayor parte de microorganismos crecen en medios con un pH neutro y en poca humedad por lo cual es necesario que en la estufa de cultivo se mantenga la misma y así el medio de cultivo no se deseeque. (Granados y Villaverde, 2003: p.7)

Por otro lado las bacterias pueden crecer entre muy altas y bajas temperaturas como se menciona en la tabla 11-1.

Tabla 11-1: Clasificación de las bacterias por su temperatura.

CLASIFICACIÓN	TEMPERATURA
Psicrofílicas	Crecen entre 2-5°C (10-30°C óptimo)
Mesofílicas	Crecen entre 10-45°C (30-40°C óptimo)
Termofílicas	Crecen poco a 37°C (50-60°C óptimo)

Fuente: FERNÁNDEZ, 2010

1.8.2 Siembra de microorganismos

Sembrar es colocar de manera artificial un inóculo en un medio de cultivo determinado, para que de esta manera el microorganismo se multiplique luego de que se lo ha incubado a una temperatura adecuada. (Santambrosio, 2009)

En la siembra de un microorganismo en un medio de cultivo, se debe tener especial cuidado de hacerlo de manera aséptica, realizando solamente las manipulaciones indispensables junto a un mechero o dentro de una cámara de flujo laminar. (Santambrosio, 2009)

1.8.3 Recuento de microorganismos

Consiste en determinar el número de microorganismos presentes en una muestra, para lo cual se requiere que haya pasado al menos 24 horas después de la inoculación, se utilizan medios de cultivo dependiendo del microorganismo que se quiere cuantificar. Se puede contar tanto los microorganismos vivos (recuento de viables) o los vivos y muertos. (recuento de totales). (Universidad Técnica Federico Santa María, 2011)

Los tipos de recuento de microorganismos pueden clasificarse en directos e indirectos. En el recuento directo se cuentan las células observándolas al microscopio, en cambio en el recuento indirecto se determina la cantidad de microorganismos por su crecimiento o alguna propiedad de

los mismos como por ejemplo la turbidez o determinando las funciones metabólicas relacionadas con el crecimiento. (Universidad Técnica Federico Santa María, 2011)

1.8.3.1 Métodos de conteo del crecimiento microbiano

Dentro de los métodos de recuento de microorganismos tenemos los que son para el recuento de totales y para el recuento de viables. (Universidad Técnica Federico Santa María, 2011)

- Recuento de microorganismos totales

Entre los métodos de recuento de microorganismos totales tenemos:

Recuento microscópico: Para este tipo de recuento se utiliza la cámara de Petroff-Hausser o de Neubauer en la cual se coloca una gota de cultivo, se cuentan las células de varios cuadrados grandes, se saca un promedio que se multiplica por 1000 para obtener el número de células en un cm^3 . (Universidad Técnica Federico Santa María, 2011)

Turbidimetría: La turbidez que generan los microorganismos en crecimiento se puede medir en un espectrofotómetro, un volumen de cultivo es colocado en un tubo de vidrio especial el cual es interpuesto entre una unidad de foco luminoso y una unidad fotoeléctrica, la cual se encuentra acoplada a un disco de lectura mismo que registra el porcentaje de luz transmitida que se relaciona inversamente con la turbidez. (Universidad Técnica Federico Santa María, 2011)

- Recuento de microorganismos viables

Dentro de los métodos de recuento de microorganismos viables tenemos:

Cuenta en placa: Es la técnica más usada, permite estimar el número de células viables de cultivo, en algunos casos se emplean soluciones diluidas de la muestra concentrada, este tipo de conteo se usa para bacterias, levaduras y hongos filamentosos, se reporta como Unidades Formadoras de Colonias (UFC) /unidad de volumen (mL) o peso (g). (Universidad Técnica Federico Santa María, 2011)

Número más probable (NMP): Denominada también como técnica de dilución en tubo, permite estimar de manera estadística la densidad microbiana tomando en cuenta que a menor volumen

de muestra inoculada disminuye la posibilidad de que en los tubos exista un crecimiento positivo. (Universidad Técnica Federico Santa María, 2011)

Recuento por Microscopía de Fluorescencia: Al añadir el compuesto naranja de acridina este se integra al ADN de las bacterias, por lo tanto las células vivas se vuelven fluorescentes. (Universidad Técnica Federico Santa María, 2011)

1.8.4 Características macroscópicas de las colonias

Las bacterias suelen reproducirse de manera rápida cuando se siembran en medios de cultivo sólidos apropiados, se incuban alrededor de 24 horas a una temperatura adecuada volviéndose visibles a manera de colonias. Cabe mencionar que una colonia se forma del conjunto de descendientes originados a partir de una célula sobre un medio de cultivo sólido. (Díaz, 2009) (Pérez y Mota, 2006)

Las características morfológicas principales de una colonia bacteriana aislada sobre un medio de cultivo son el tamaño, borde, elevación sobre el medio de cultivo, superficie, consistencia, pigmentación, olor, etc, las cuales generan bases fundamentales que permiten estudiarlas de manera sistemática e identificarlas, algunas de estas características dependen del medio de cultivo y de las condiciones de incubación. (Fernández, 2010, p.4) (Díaz, 2009)

- **Tamaño:** Las colonias poseen un tamaño uniforme para cada especie, miden desde 0.5 mm en el caso de *Haemophilus spp.* o *N. gonorrhoeae* e incluso pueden ser de un tamaño mayor como en las enterobacterias. Algunas colonias miden menos de 1mm de diámetro como en los estreptococos y hasta 1 cm de diámetro en los estafilococos y algunos bacilos. (Díaz, 2009) (Pérez y Mota, 2006)

En términos generales las colonias se describen luego de compararlas entre sí como grandes, medianas y pequeñas. (Díaz, 2009)

Pequeñas: Menor o igual a 1mm de diámetro

Medianas: Hasta 4mm de diámetro

Grandes: Mayor de 4mm de diámetro (Díaz, 2009)

- Forma de la colonia: Depende del borde y espesor de la misma, pudiendo ser circular, puntiforme, irregular, filamentosa, rizoide o fusiforme. (Fernández, 2010, p.5)
- Borde y elevación de la colonia: En general existen varias posibilidades de bordes como enteros si son homogéneos, ondulados como en el *Bacillus anthracis*, bordes dentados o en sierra como en la *Yersinia pestis*, bordes lisos en el caso de *Proteus vulgaris* o *Escherichia coli*, lobulados es decir curvados de manera irregular o filamentosos. En cuanto a la elevación la colonia puede ser plana, convexa o elevada. (Díaz, 2009)
- Superficie de la colonia: Es el aspecto de la colonia observada mediante luz reflejada, la bacteria puede tener aspecto liso y brillante como en el género *Streptococcus* o aspecto irregular, rugosa, mate y opaca como en el género *Staphylococcus*, su aspecto también puede ser filamentosos o cerebroide. (Díaz, 2009)
- Consistencia: La consistencia de una colonia bacteriana está relacionada con su estructura o rigidez, se puede apreciar al tocarla con el asa de siembra y puede ser dura si son difíciles de manipular, se fragmentan al cogerlas con el asa y se desliza de manera fácil sobre el medio de cultivo; otras colonias pueden tener apariencia cremosa y grasienta de superficie brillante y fácil manipulación. (Díaz, 2009)

En su mayor parte las colonias presentan una consistencia mantecosa de fácil manipulación con el asa, y algunas veces aparecen colonias viscosas y pegajosas que forman filamentos mucosos cuando se las toma con el asa como se observa en la figura 13-1. (Díaz, 2009)



Figura 13-1: Colonias viscosas y pegajosas

Fuente: ATLAS DE BACTERIOLOGÍA, 2010

- Pigmentación: Se puede observar en las colonias no en células individuales, en cuanto al color de la colonia esta puede ser verde característico de la *Pseudomonas aeruginosa*, amarillo dorado del *Staphylococcus aureus*, grisáceo del *N. meningitidis*. (Díaz, 2009)

- Olor: Algunas bacterias descomponen los sustratos que usan para su metabolismo generando de esta manera compuestos volátiles que les otorgan un olor específico a sus cultivos puros. Las colonias pueden presentar un olor frutal como el caso de la *Pseudomonas aeruginosa* o un olor putrefacto típico de los microorganismos anaerobios. (Díaz, 2009)
- Hemólisis: Capacidad de las bacterias de realizar la lisis de los hematíes del agar sangre debido a que liberan hemolisinas. Los cocos son las bacterias que tienen más probabilidad de generar hemólisis, como se mencionó anteriormente la hemólisis generada puede ser intensa denominada beta hemólisis, incompleta conocida como alfa hemólisis o inclusive no puede existir denominada gamma hemólisis. (Fernández, 2010, p.5) (Díaz, 2009)

1.8.5 Aislamiento de microorganismos

En el caso de que se quieran aislar microbios específicos, se usan técnicas selectivas que emplean medios de cultivo que permiten el desarrollo únicamente de esos microorganismos. (Pisabarro, 2005)

El aislamiento de las bacterias provenientes de muestras naturales se efectúa principalmente en medios de cultivo sólidos mediante la producción de colonias aisladas, para esto se siembra por extensión en placa una muestra que contiene microorganismos y se espera el desarrollo de colonias aisladas que luego serán sometidas a una siembra por agotamiento de estrías y finalmente a una serie de repiques para conseguir la estabilidad del aislado bacteriano. (Pisabarro, 2005)

Una bacteria aislada se reproduce luego de un período de incubación en condiciones ambientales adecuadas generándose una colonia observable a la vista, la cual está constituida por individuos iguales a lo que se conoce como clon bacteriano. (Pisabarro, 2005)

A pesar de esto algunos microorganismos provenientes de muestras ambientales no pueden ser cultivables, debido a dificultades intrínsecas en el cultivo como por ejemplo el desconocimiento de los requerimientos específicos de la bacteria mismos que no pueden ser solventados. (Pisabarro, 2005)

Las técnicas de aislamiento se basan en la disminución del número de microorganismos hasta obtener células aisladas, al principio se utilizó diluciones seriadas en medio líquido pero se presentaban microorganismos no deseados, luego se introdujeron los medios sólidos en los que

se puede realizar un agotamiento por estrías en superficie o un agotamiento de asa en superficie. (Pisabarro, 2005)

1.8.5.1 Cultivo puro

Un cultivo puro o axénico es aquel que contiene una única clase de microorganismos que proceden de una sola célula con la misma composición genética, su crecimiento en medio sólido genera una masa de células visibles denominada colonia. (Madigan, 2004, pp.108-109) (Pisabarro, 2005)

Los cultivos puros provienen de colonias aisladas y son fundamentales para realizar el estudio de las características de un microorganismo, además son el punto de partida para poder identificar las bacterias, a continuación se muestra la figura 14-1 de cultivos puros. (Pisabarro, 2005)

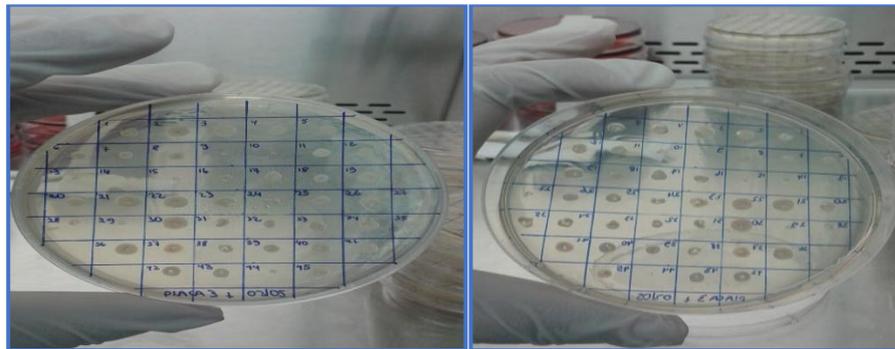


Figura 14-1: Cultivos puros de microorganismos del Balneario El Cachaco.

Fuente: CORTES Sandra, 2016

1.9 Identificación bacteriana

Es un conjunto de procedimientos y técnicas que se aplican para determinar cuál es la identidad de un microorganismo. (Fernández, 2010, p.3)

La clasificación taxonómica de la bacteria permite describirla y diferenciarla de una gran variedad de especies dándole un nombre y agrupándola de acuerdo a sus semejanzas, esta clasificación se

realiza a través de técnicas de cultivo a fin de identificar las bacterias, las categorías utilizadas son familia para referirse a un grupo de géneros, género a un grupo de especies y especie a un grupo de colonias todos relacionados entre sí. (Fernández, 2010, p.3) (Procedimientos Diagnósticos, 2008)

Además una aplicación importante del proceso de identificación bacteriana es la tipificación de microorganismos patógenos que causan infecciones en el hombre pues esto nos permite conocer cuál fue la causa de la enfermedad y poder proporcionar el tratamiento antibiótico más eficiente, además de un seguimiento y control de las infecciones. (Procedimientos Diagnósticos, 2008)

En el laboratorio de microbiología se aplican técnicas fenotípicas de identificación bacteriana convencionales de costo asequible, las cuales se basan en observar las características de las bacterias, su morfología, desarrollo, propiedades bioquímicas y metabólicas desconocidas y compararlas con un cultivo tipo. En caso de que la bacteria no pueda ser identificada con estas técnicas se utiliza técnicas genotípicas. (Fernández, 2010, p.3) (Procedimientos Diagnósticos, 2008)

Para la realización de una correcta identificación bacteriana juega un papel primordial la experiencia del investigador pues de esta manera podrá seleccionar la o las pruebas de forma secuencial según el género o especie de la bacteria, el origen del aislado bacteriano o el coste de las pruebas. (Fernández, 2010, p.3)

1.9.1 Técnicas para la identificación bacteriana

Una vez aislada la bacteria las técnicas que se deben realizar para la identificación son:

- Obtener un cultivo puro (axénico) del microorganismo a partir de la muestra utilizando medios sólidos selectivos o diferenciales.
- Observación microscópica de la bacteria aislada mediante una tinción Gram con lo cual se determina si esta es Gram positiva o negativa, su forma, la agrupación, presencia de esporas.
- Observación del aspecto del crecimiento en diferentes medios, la morfología de las colonias, pigmentos.
- Se realiza pruebas de identificación como las pruebas bioquímicas para conocer la actividad enzimática de la bacteria y los metabolitos que produce. (Fernández, 2010, p.4) (Procedimientos Diagnósticos, 2008)

1.9.2 Tinción Gram

Es una coloración diferencial, debe su nombre a Christian Gram quien la descubrió en 1884, es la más usada en bacteriología, emplea 4 reactivos químicos que son aplicados en un frotis de la muestra fijada al calor. (Madigan, 2004, p.58) (Prescott, 2004, p.29)

El primer reactivo es un colorante primario de las células, el segundo reactivo es un mordiente que aumenta la afinidad del colorante primario formando el complejo cristal violeta-yodo, el tercero es un decolorante que en la parte externa de las bacterias Gram negativas disuelve los lípidos haciéndola más porosa no así en el caso de las bacterias Gram positivas y el último es un colorante de contraste que tiñe de rojo las células decoloradas. (Winn, 2006, p.21) (Prescott, 2004, p.29)

En la tabla 12-1 se muestra el tiempo de aplicación de cada reactivo y el color que toman las bacterias.

Tabla 12-1: Reactivos de la tinción Gram, tiempo de aplicación y color de las bacterias Gram positivas y Gram negativas.

REACTIVO	TIEMPO DE APLICACIÓN EN LA MUESTRA	BACTERIAS GRAMPOSITIVAS	BACTERIAS GRAMNEGATIVAS
Cristal violeta (colorante)	1 minuto	Violeta	Violeta
Lugol (mordiente)	1 minuto	Violeta	Violeta
Alcohol-acetona (decolorante)	30 segundos	Violeta	Incolora
Safranina (colorante de contraste)	1 minuto	Violeta	Rosada

Fuente: MADIGAN, 2004

Según como las bacterias responden a la coloración se las puede clasificar en dos grupos, las bacterias Gram positivas se tornan de un color azul violeta mientras que las bacterias Gram negativas adquieren un color rosado o rojo. (Prescott, 2004, p.64)

Esta diferencia entre las bacterias se debe a la naturaleza física de su pared celular, es así que las bacterias Gram positivas poseen una pared celular gruesa formada de peptidoglicano y ácidos

teicoicos como se indica en la figura 15-1, lo cual hace que las bacterias retengan el reactivo cristal violeta, luego se añade el lugol para ayudar a retener el colorante, durante la decoloración el alcohol cierra los poros de la capa de peptidoglicano y así adquiere su color azul violeta. (Madigan, 2004, p.81) (Winn, 2006, p.178) (Prescott, 2004, pp.59-64) (Pérez y Mota, 2006)

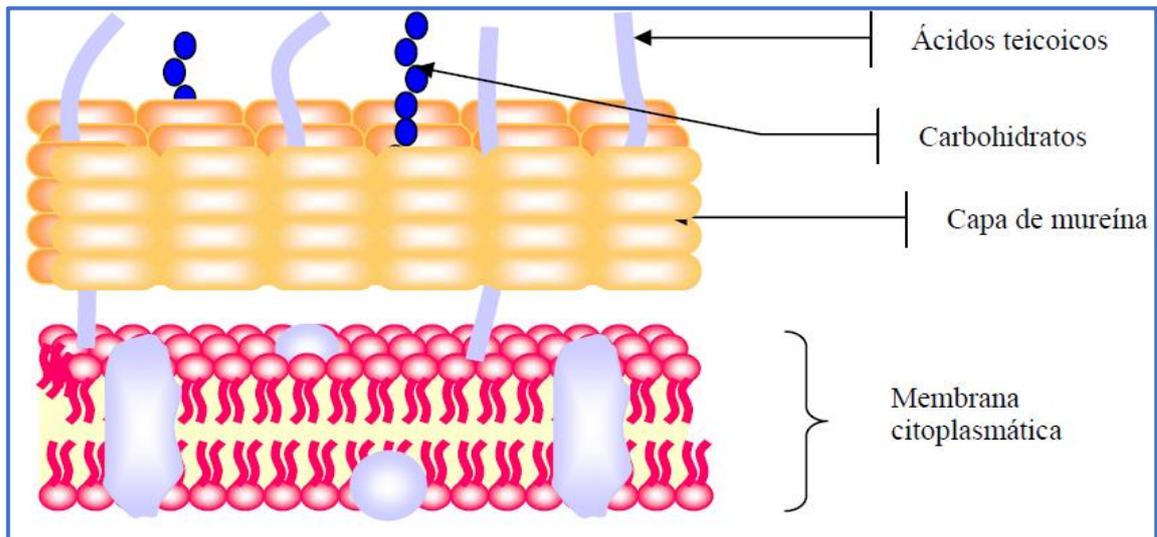


Figura 15-1: Esquema de la ultraestructura de la pared celular de las bacterias Gram positivas.

Fuente: MERINO, 2010

En cambio las bacterias Gram negativas poseen una pared celular constituida por tres partes que son la membrana plasmática, espacio periplásmico (formado de una capa fina de peptidoglicano) y la membrana externa que sirve como barrera protectora como se muestra en la figura 16-1. (Winn, 2006, p.180) (Pérez y Mota, 2006)

Unas pocas cadenas de peptidoglicano están unidas a otras cadenas paralelas, el resto permanecen sueltas en un fluido conformado de agua y moléculas libres que constituyen el gel periplásmico conocido como espacio periplásmico, afuera de este se encuentra la membrana externa compuesta por dos semicapas la interior de fosfolípidos y la exterior de lipopolisacáridos. (Winn, 2006, pp.180-181) (Pérez y Mota, 2006)

Además posee grandes poros, durante la decoloración el alcohol extrae lípidos de la membrana externa aumentando así la porosidad de esta por lo cual el reactivo cristal violeta y el lugol se eliminan de manera fácil de estas bacterias. (Madigan, 2004, p.81) (Prescott, 2004, p.64) (Pérez y Mota, 2006)

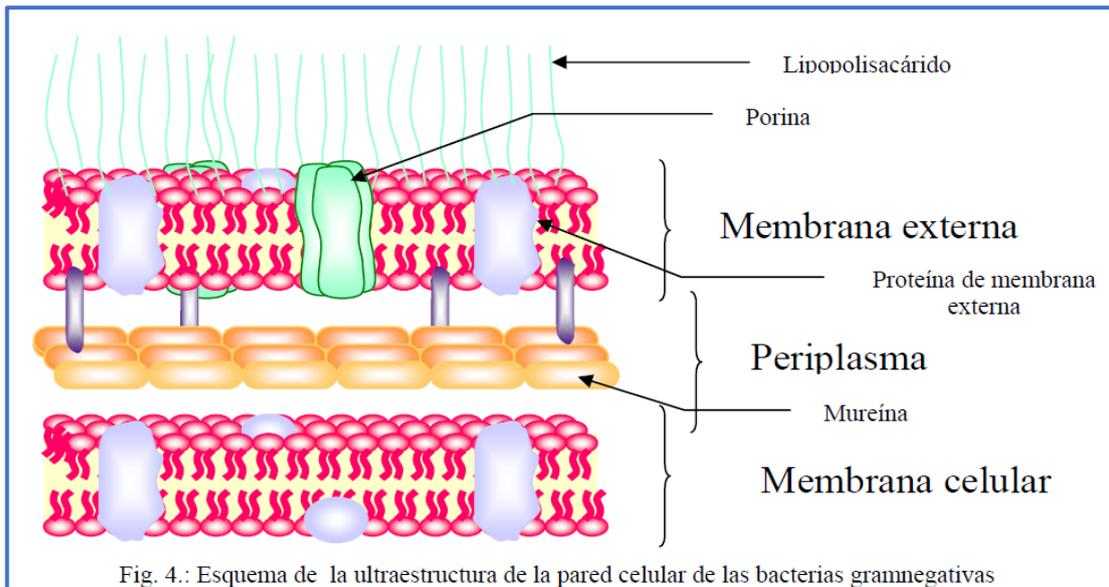


Figura 16-1: Esquema de la ultraestructura de la pared celular de las bacterias Gram negativas.

Fuente: MERINO, 2010

1.10 Pruebas bioquímicas

Son un complemento de otros estudios bacteriológicos, permiten conocer las propiedades fisiológicas y bioquímicas de una bacteria pues estas determinan la presencia de ciertas enzimas en las vías metabólicas las cuales reflejan la expresión de un gen en el ADN bacteriano, también ponen de manifiesto las características metabólicas de las bacterias. (Fernández, 2010, p.6) (Procedimientos Diagnósticos, 2008)

Para realizar estas pruebas se debe contar con un cultivo fresco de 18 a 24 horas de incubación en un medio en que la bacteria crezca adecuadamente y que contenga un indicador que hace cambiar el color del medio cuando el microorganismo realice alguna de sus funciones. (Fernández, 2010, p.6) (Procedimientos Diagnósticos, 2008)

Algunas pruebas bioquímicas son rápidas como las que permiten evaluar la presencia de una enzima cuya lectura se realiza en pocos segundos u horas, sin embargo otras pruebas necesitan que el microorganismo crezca luego de una incubación de 18 a 48 horas como las que detectan componentes metabólicos o que permiten determinar la sensibilidad de un microorganismo a un medicamento o el cultivo de la bacteria en medios que permiten identificarla. (Fernández, 2010, p.5)

1.10.1 Prueba de la Catalasa

La catalasa es una enzima que se encuentra en la mayor parte de los microorganismos aerobios y anaerobios facultativos que contienen citocromo excepto en los *Streptococcus*, la catalasa descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular que se manifiesta en forma de burbujas al añadir una gota de agua oxigenada sobre la colonia. (Winn, 2006, p.38) (Granados y Villaverde, 2003: pp.98-99) (Fernández, 2010, p.6)

La mayor parte de bacterias anaerobias en lugar de la enzima catalasa tienen la enzima flavoproteínica NADH₂ peroxidasa que de igual manera descompone el peróxido de hidrógeno generando únicamente agua. (Universidad Técnica Federico Santa María, 2011)

Esta prueba permite identificar dos grupos de cocos Gram positivos como son los estafilococos que dan reacción positiva, de los estreptococos que dan reacción negativa, es así que por ejemplo la familia *Micrococcaceae* da reacción positiva en cambio el género *Streptococcus* spp. y *Enterococcus* spp. dan una reacción negativa. (Fernández, 2010, p.6)

1.10.2 Prueba de la Oxidasa

Esta prueba permite conocer si la bacteria posee enzimas oxidadas, la reacción se debe a que el sistema citocromo oxidasa activa la oxidación del citocromo que es reducido en presencia de oxígeno molecular a agua o peróxido de hidrógeno dependiendo de la especie de la bacteria, el oxígeno es el aceptor final de electrones en el sistema de transferencia de electrones. (Granados y Villaverde, 2003: p.97) (Fernández, 2010, p.5) (Universidad Técnica Federico Santa María, 2011)

El sistema citocromo oxidasa se encuentra en las bacterias aerobias, algunas anaerobias facultativas y escasamente en alguna microaerófila en cambio las bacterias anaerobias carecen de este sistema. (Granados y Villaverde, 2003: p.97)

1.10.3 Óxido-Fermentación

Para esta prueba al medio semisólido Hugh-Leifson se le añade 1% de un azúcar como la glucosa, esta prueba permite conocer si el microorganismo metaboliza el azúcar por vía oxidativa o fermentativa, en la vía oxidativa el oxígeno es el aceptor final de electrones por lo cual el proceso es aerobio generando poca acidez, en la vía fermentativa un compuesto orgánico es el aceptor final de electrones, el proceso es anaerobio y produce bastante acidez. (Fernández, 2010, p.7) (Universidad Técnica Federico Santa María, 2011)

El indicador azul de bromotimol hace que el medio cambie a un color amarillo cuando se producen ácidos producto del metabolismo. (Procedimientos Diagnósticos, 2008)

1.10.4 Prueba del agar hierro de Kligler

Este medio de cultivo ayuda a diferenciar enterobacterias, contiene los carbohidratos glucosa al 0.1% y lactosa al 1% y el indicador rojo fenol, permite conocer que hidrato de carbono metaboliza el microorganismo, si produce o no gases (CO_2 o H_2) como producto final del metabolismo de los carbohidratos y si hay producción de ácido sulfhídrico. Para que se produzca el ácido sulfhídrico el medio cuenta con tiosulfato de sodio, el citrato de hierro y amonio junto con el ácido sulfhídrico generan un color negro debido a que se forma el sulfuro de hierro. (Fernández, 2010, p.7)

1.10.5 Prueba del agar Simmons Citrato

Es una prueba que permite diferenciar enterobacterias, determina si la bacteria puede usar para su metabolismo solamente el citrato como fuente de carbono y compuestos amoniacaes como fuente de nitrógeno liberando iones amonio, si esto ocurre el medio se alcaliniza virando su color de verde a azul. (Winn, 2006, p.217) (Granados y Villaverde, 2003: p.139) (Fernández, 2010, p.8)

El citrato es metabolizado en bacterias que poseen citrato permeasa mediante el ciclo del ácido tricarboxílico que genera oxalacetato y piruvato, el piruvato en un medio alcalino produce ácidos orgánicos que luego de ser usados como fuente de carbono originan carbonatos y bicarbonatos alcalinos y al mismo tiempo el medio vira a azul. (Universidad Técnica Federico Santa María, 2011)

1.10.6. Prueba de la Ureasa

Esta prueba pone de manifiesto la capacidad de la bacteria de desdoblar la úrea en dos moléculas de amoníaco gracias a la enzima ureasa, permite diferenciar a los género como *Proteus*, *Klebsiella*, que dan una reacción positiva de otras enterobacterias que lo hacen de manera retardada o que dan negativo como en el caso de la *Escherichia coli*, *S. typhimurium*. (Winn, 2006, p.218) (Granados y Villaverde, 2003: p.103) (Fernández, 2010, p.6) (Universidad Técnica Federico Santa María, 2011)

El medio de cultivo úrea contiene extracto de levadura que aporta nutrientes esenciales para el desarrollo de las bacterias, sales de fosfatos como sistema buffer, el rojo fenol es el indicador de pH y la úrea que es el sustrato de la ureasa. Las bacterias que poseen la enzima hidrolizan la urea liberando amoníaco, agua y dióxido de carbono, los cuales alcalinizan el medio que vira el color de amarillo a rojo cereza. (Laboratorios Britania S.A., 2010b)

1.10.7 SIM

Permite identificar bacilos entéricos de acuerdo a su capacidad de producir ácido sulfhídrico, indol y movilidad. Las bacterias que reducen el sulfato generan ácido sulfhídrico que reacciona con el amonio ferroso produciendo sulfato ferroso como un precipitado oscuro en el inóculo, la caseína es usada por algunos microbios para producir indol el cual se revela con el reactivo de Ehrlich. (Granados y Villaverde, 2003: p.133)

Debido a que este medio es semisólido la movilidad se comprueba con un crecimiento fuera de la línea de siembra a manera de turbidez si no hay movilidad solo se produce crecimiento a lo largo de la línea de siembra. (Winn, 2006, p.220)

1.10.7.1. Indol:

Esta prueba permite diferenciar de manera cualitativa los microorganismos que tienen capacidad de producir indol, ácido pirúvico y amonio partiendo del L-triptófano. (Winn, 2006, p.216) (Granados y Villaverde, 2003: p.134) (Fernández, 2010, p.7) (Universidad Técnica Federico Santa María, 2011)

La liberación del indol se produce debido a la degradación del aminoácido triptófano en presencia de la enzima triptofanasa. En un medio que contiene triptófano, el indol que es incoloro se manifiesta gracias a su capacidad de combinarse con el aldehído del reactivo de Kovacs o de Ehrlich (p-dimetil-aminobenzaldehído) y formar un compuesto coloreado. (Winn, 2006, p.216) (Granados y Villaverde, 2003: p.134)

1.10.8 Prueba de la Coagulasa

Esta prueba permite diferenciar *Staphylococcus aureus* (coagulasa positivos) del resto de estafilococos, pone de manifiesto la capacidad del microorganismo de coagular el plasma mediante la acción de la enzima coagulasa que convierte el fibrinógeno en fibrina formando un coágulo, se la realiza en tubo pequeño y se lee luego de 4 horas de haber sido incubado si es negativa se puede leer hasta dentro de 24 horas. (Granados y Villaverde, 2003: p.104) (Fernández, 2010, p.7) (Procedimientos Diagnósticos, 2008)

Se puede realizar esta prueba tomando una colonia de la placa de aislamiento pero es mejor usar una colonia cultivada en un medio líquido de enriquecimiento como la infusión cerebro-corazón durante 18 a 24 horas. (Fernández, 1993)

Durante su crecimiento el *Staphylococcus aureus* produce la enzima coagulasa de naturaleza proteica, a la cual la acción de las enzimas proteolíticas la inactivan. (Fernández, 1993)

1.10.9 Crecimiento en caldo hipersalino

Esta prueba permite conocer si los microorganismos son capaces de crecer en medios de cultivo con cloruro de sodio en una concentración del 6.5%, separa las especies de *Enterococcus* de los estreptococos no enterococos grupo D *S. bovis* y *S. equinus*. El medio de cultivo base para esta prueba es el caldo soja tripticasa con cloruro de sodio al 6.5%, la incubación dura de 24 a 48 horas sin embargo se debe esperar hasta las 72 horas. (Winn, 2006, p.684) (Fernández, 2010, p.8)

1.10.10 Hidrólisis de la gelatina

Para que las proteínas entren en la célula bacteriana deben ser degradadas a polipéptidos y aminoácidos; la gelatina es una proteína de poco valor nutritivo que permite determinar la actividad proteolítica, es decir conocer si la bacteria puede producir gelatinasas e hidrolizar la gelatina. El agar base para esta prueba es el agar nutritivo al que se le agrega gelatina al 1%, antes de la lectura se rocía sobre la placa Petri una solución de cloruro mercúrico, HCl y agua destilada. (Fernández, 2010, p.7) (Universidad Técnica Federico Santa María, 2011) (Clavell, 2009)

1.10.11 Hidrólisis del almidón

Permite detectar la presencia de la enzima amilasa que hidroliza el almidón en glucosa y restos de maltosa para que sean utilizados por los microorganismos, el agar base utilizado para esta prueba es el agar nutritivo al cual se le añade almidón al 1%. Para leer la prueba se esparce lugol en toda la placa Petri, al entrar en contacto el almidón y el lugol aparece una coloración azul-parda. (Universidad Técnica Federico Santa María, 2011)

1.11 Antimicrobiano

Sustancia química producida por un microorganismo (hongo o bacteria), sintética o semisintética que inhibe el crecimiento de otro organismo (efecto bacteriostático) o lo destruye (efecto bactericida), se dividen en antibacterianos, antivirales, antimicóticos, antimicobacterianos, antiparasitarios. (Quintana, 2004) (Girón, 2008) (Seija y Vignoli, 2006)

1.11.1 Antibiótico

Subgrupo de antimicrobianos con actividad antibacteriana, generalmente son medicamentos usados en el tratamiento de infecciones bacterianas. (Seija y Vignoli, 2006)

Establecen un grupo heterogéneo de sustancias con un variado comportamiento farmacocinético y farmacodinámico, ejercen su acción sobre una estructura o función del microorganismo, poseen elevada potencia biológica por lo cual pueden actuar a concentraciones bajas y su toxicidad es selectiva. (Seija y Vignoli, 2006)

1.11.1.1 Clasificación de los antibióticos

Los antibióticos se clasifican según varios criterios entre estos tenemos su efecto antibacteriano, espectro de acción, mecanismo de acción o estructura molecular.

- De acuerdo a su efecto antibacteriano:

Bacteriostáticos: Detienen el desarrollo del microorganismo sin destruir las células. (Quintana, 2004)

Bactericidas: Producen lisis de la bacteria. (Quintana, 2004)

- De acuerdo a su espectro de acción:

Antibióticos de amplio espectro: Ejercen su acción sobre una gran cantidad de microorganismos Gram positivos y negativos por ejemplo las cefalosporinas, aminoglucósidos y quinolonas. (Seija y Vignoli, 2006) (Quintana, 2004)

Antibióticos de espectro reducido: Ejercen su acción sobre un grupo delimitado de especies bacterianas por ejemplo la vancomicina y la eritromicina que actúan únicamente sobre los Gram positivos. (Seija y Vignoli, 2006) (Quintana, 2004)

- De acuerdo a su mecanismo de acción:

Inhibidores de la formación de la pared bacteriana: Impiden la síntesis de la pared bacteriana por lo cual la célula no resiste los cambios osmóticos, se hincha y estalla. (Sáenz, 2014)

Inhibidores de la síntesis de proteínas: Unos antibióticos inhiben la transcripción para lo cual la subunidad beta de la enzima ARN polimerasa ADN dependiente es inhibida lo cual a su vez inhibe la síntesis de ARN mensajero encargado de transmitir la información al ADN para que se formen las proteínas; otros en cambio inhiben la traducción mediante la unión de la molécula del antibiótico a la subunidad 30S o 50S del ribosoma de la bacteria. (Madigan, 2004, p.705) (Sáenz, 2014) (Flórez, 2007, p.3)

Inhibidores de la duplicación del ADN: Se pueden dar dos casos, el primero es la inhibición de una topoisomerasa (ADN girasa) esencial para la replicación del ADN o mediante la formación de compuestos tóxicos para las bacterias que provienen de la reducción del grupo nitro de los nitrimidazólicos los cuales se conjugan con el ADN desestabilizándolo y provocando la muerte de la bacteria. (Sáenz, 2014) (Flórez, 2007, p.3)

Antibióticos que afectan la membrana citoplasmática: Los antibióticos actúan como detergentes o tensoactivos catiónicos que producen la alteración de la membrana celular, modifican la permeabilidad permitiendo que los aminoácidos intracelulares, purinas, pirimidinas y otras moléculas esenciales para la vida salgan de la célula. (Sáenz, 2014) (Flórez, 2007, p.3)

Inhibidores de las vías metabólicas o quimioterápicos: Las sulfamidas y la trimetoprim causan una inhibición de las vías metabólicas e impide el desarrollo de la bacteria y por ende su acción bacteriostática, pero si las dos se administran iguales su acción es bactericida. (Sáenz, 2014)

- De acuerdo a su estructura molecular:

Betalactámicos: Son bactericidas de amplio espectro de origen natural o semisintético que presentan un anillo betalactámico, ocasionan muy pocos efectos adversos entre estos se encuentran las penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos, carbapenem. Su mecanismo de

acción es la inhibición de la síntesis de la pared celular bacteriana y su mecanismo de resistencia es la producción de betalactamasas que hidrolizan el anillo betalactámico. (Seija y Vignoli, 2006)

Glicopéptidos: Son antibióticos bactericidas que inhiben la formación de la pared bacteriana, alteran la permeabilidad de la membrana citoplasmática y la síntesis de ARN, por ejemplo la vancomicina que actúa sobre microorganismos Gram positivos y teicoplanina, estos antibióticos casi no desarrollan resistencia. (Seija y Vignoli, 2006)

Aminoglucósidos: Antibióticos bactericidas que ejercen acción sobre bacterias Gram negativas, se unen a la subunidad 30S del ribosoma de manera irreversible bloqueando así la síntesis proteica del microorganismo, por ejemplo la gentamicina, amikacina y estreptomina de uso parenteral. (Madigan, 2004, p.707) (Seija y Vignoli, 2006)

Macrólidos: Antibióticos bacteriostáticos y bactericidas a elevadas concentraciones, ejercen su actividad sobre cocos y bacilos Gram positivos, son recomendados para el tratamiento de infecciones respiratorias, de piel y partes blandas, se unen de manera reversible a la subunidad 50S del ARN ribosómico por ejemplo la eritromicina, claritromicina y azitromicina. (Seija y Vignoli, 2006) (Quintana, 2004)

Quinolonas: Antibióticos bactericidas que inhiben la ADN girasa que cataliza el superenrollamiento del ADN y asegura una adecuada división celular, entre estas tenemos el ácido nalidíxico y ácido pipemídico, norfloxacin y ciprofloxacina, levofloxacina, gatifloxacina. (Quintana, 2004)

Cefalosporinas: Antibióticos de origen natural que contienen un anillo betalactámico unido a un anillo de dihidrotiazida, ejercen su acción al unirse mediante un enlace covalente a las proteínas fijadoras de penicilinas (PBP). Las cefalosporinas se dividen en generaciones según el año en el que se introdujeron para su uso clínico, características farmacocinéticas y espectro de acción. (Madigan, 2004, p.706) (Quintana, 2004)

Las cefalosporinas de primera generación o espectro reducido actúan sobre los microorganismos Gram positivos y tienen una actividad modesta en los Gram negativos, las cefalosporinas de segunda generación o espectro expandido actúan sobre las enterobacterias, las de tercera generación o de amplio espectro y finalmente las cefalosporinas de cuarta generación que ejercen una mejor acción sobre microorganismos Gram positivos. (Quintana, 2004)

1.11.2 Resistencia antimicrobiana

Es la capacidad que posee un microorganismo para resistir los efectos de un antibiótico, cuya aparición afecta el costo de la atención sanitaria, pérdida de la eficacia de ciertos medicamentos, incremento del sufrimiento humano y a menudo lleva a la muerte de las personas. (Madigan, 2004, p.711)

El aumento en la resistencia bacteriana se debe a que los microorganismos han adquirido nuevos mecanismos de resistencia a los antibióticos empleados en el ámbito clínico, todo esto constituye un problema grave a nivel de la salud mundial tanto para el diagnóstico de la infección como también para encontrar un medicamento que permita combatirlo. (Manual de actualización en resistencia bacteriana y normas CLSI M100-S20, 2010, p. 5)

Por otro lado la intervención humana ha hecho que se añada al ambiente una variedad de antibióticos y de agentes antibacteriales especialmente como promotores de crecimiento en la producción animal y en la agricultura, lo cual ha causado el surgimiento de los mecanismos de resistencia de las bacterias. (Andueza, 2015, p.158.) (García, 2001, p.101) (Cabrera, 2007, 149)

Además el descubrimiento y uso de los antibióticos ha contribuido en el incremento de la resistencia bacteriana por lo cual se ha vigilado esta resistencia con microorganismos de muestras clínicas, sin embargo es importante estudiar los microorganismos de muestras ambientales pues estos pueden ser un reservorio de genes que codifican la resistencia con capacidad para transferirla de manera horizontal a los microorganismos patógenos humanos. (Ronconi, 2000)

Los antibióticos no generan la resistencia por ellos mismos sino que permiten que los microorganismos resistentes sobrevivan, se reproduzcan y se dispersen, otra manera en la que las bacterias adquieren resistencia es mediante una transferencia horizontal de genes, mediante el proceso de conjugación en el que se intercambian plásmidos o por transformación. (García, 2001, 101-102) (Pedrique, 2002)

Todo esto ha generado un aumento en la resistencia de las bacterias a los antibióticos lo cual pudiera provocar enfermedades difíciles de tratar, es así que el Centro de Control de Enfermedades (CDC) menciona que cerca del 70% de las infecciones de los pacientes hospitalizados presenta resistencia a los antibióticos. (FDA, 2007) (Pérez, 1998, p.58)

La Organización mundial de la Salud OMS (2016) menciona que en el año 2012 se incrementó la resistencia a los medicamentos contra el VIH, en el año 2013 aparecieron casos de tuberculosis multirresistente, en todo el mundo las infecciones frecuentes se han vuelto resistentes, lo cual

produce un mal pronóstico en la salud de las personas, mayor riesgo mortal pues anula la acción curativa de los antibióticos y disminuye las cepas susceptibles a los mismos. (Meade, 2001)

Las infecciones por enterococos han sido causadas en un 90% por la especie *E. faecalis* y en un 10% por *E. faecium*, los enterococos han demostrado ser más resistentes que los estreptococos a los antibióticos mientras que la penicilina, ampicilina y vancomicina no son activos para la mayoría de estos microorganismos. (Ronconi, 2000)

1.11.2.1 Causas de la resistencia antimicrobiana

Las principales causas de resistencia antimicrobiana son:

- Uso irracional de antibióticos
- Uso excesivo de antibióticos de amplio espectro como las cefalosporinas de segunda y tercera generación.
- Prescripciones innecesarias
- Diagnósticos equivocados
- Antibióticos como aditivos en alimentos animales
- La dosis del antibiótico es mayor o inferior a la adecuada para el paciente
- El tratamiento antibiótico es corto o muy largo
- Uso inadecuado de los antibióticos por parte del paciente (García, 2001, p.101) (Apaza y García, 2011)

Otra fuente de antibióticos en el ambiente son las aguas servidas y otros depósitos de agua pues no todos los antibióticos que ingerimos son procesados en el cuerpo, la descarga de los desechos médicos, de la producción de antibióticos y de los productos antibacteriales, estas aguas pueden filtrarse o tener contacto con las aguas termales de alguna manera generando cambios en la resistencia de la microbiota autóctona del agua termal. (Andueza, 2015, 158.) (García, 2001, p.101) (Cabrera, 2007, 149)

1.11.2.2 Tipos de resistencia

La resistencia antibiótica puede ser:

- Natural o intrínseca: Propia de la familia, especie o grupo de bacteria, no es variable ni está relacionada al uso de antibióticos, se produce por mutaciones al azar, o por la ausencia de la diana molecular de acción, por ejemplo todos los microbios Gram negativos son resistentes a la vancomicina. (Pérez, 1998, p.59) (Apaza y García, 2011) (Pérez y Robles, 2013, p.188) (Flórez, 2007, p.5)
- Adquirida: Es variable y adquirida por una cepa de una especie bacteriana que luego será transferida a su descendencia, afecta a algunos integrantes de la especie no a su totalidad, puede ser cromosómica si se produce por una mutación espontánea o extracromosómica si ocurre por incorporación del material genético a través de plásmidos o transposones. (Pérez, 1998, p.59) (Apaza y García, 2011) (Pérez y Robles, 2013, p.188) (Flórez, 2007, p.6)

1.11.2.3 Mecanismos de resistencia

Para que el antibiótico llegue a su sitio de acción debe atravesar la membrana externa y el espacio periplásmico y si la diana de acción es intracelular debe atravesar también la membrana celular. Si la bacteria produce enzimas hidrolíticas el antibiótico deberá soportar la acción de esas enzimas en el espacio periplásmico de los microorganismos Gram negativos o en el entorno de los microorganismo Gram positivos. El antibiótico debe llegar intacto al sitio de acción para así poder ejercer su acción bactericida o bacteriostática. (Pérez, 1998, p.59) (Apaza y García, 2011) (Pérez y Robles, 2013, p.189)

Dentro de los mecanismos que impiden que el antibiótico alcance su diana biológica tenemos:

- Hidrólisis enzimática del antibiótico: Desde el punto de vista clínico es el mecanismo primordial pues media la resistencia a los antibióticos de mayor uso como betalactámicos, aminoglucósidos y macrólidos, en este caso la enzima producida por la bacteria inactiva el antibiótico evitando que ejerza su acción, una de las enzimas que destruyen la estructura

química son las betalactamasas que hidrolizan el núcleo betalactámico. (Pérez, 1998, p.59) (Apaza y García, 2011) (Pérez y Robles, 2013, p.189) (Flórez, 2007, p.7)

- Trastornos de la permeabilidad: La bacteria puede impedir que el antibiótico alcance una concentración adecuada en la diana biológica evitando que entre al medio intracelular o promoviendo su salida hacia el medio extracelular mediante el mecanismo activo de eflujo del antibiótico. (Pérez, 1998, p.59) (Apaza y García, 2011) (Pérez y Robles, 2013, p.189) (Flórez, 2007, p.8)

Estos trastornos además se pueden producir por pérdida de la capacidad de transporte activo a través de la membrana celular o cambios en los receptores bacterianos para los antibióticos. (Pérez y Robles, 2013, p.189)

- Alteraciones del sitio blanco de acción: Estos trastornos hacen que el lugar de acción no sea reconocido por el antibiótico y así no ejerza su efecto, como por ejemplo las alteraciones en las subunidades 30S y 50S del ribosoma que participan en la resistencia a los aminoglucósidos, el cloranfenicol y los macrólidos, cambios en las PBP que involucran resistencia a los betalactámicos o alteraciones de la DNA girasa que participan en la resistencia a las quinolonas. (Pérez, 1998, p.59) (Apaza y García, 2011) (Pérez y Robles, 2013, p.189) (Flórez, 2007, pp.6-7)

1.11.2.4 Mecanismos de transferencia de resistencia

Dentro de los mecanismos de transferencia de resistencia microbiana tenemos:

Plásmidos: Son segmentos circulares de ADN extracromosómico que le permite a la bacteria resistir a un antibiótico, los plásmidos se replican de manera independiente del ADN cromosómico y son heredados por las células hijas, le otorgan a la bacterias mejores rasgos de supervivencia, se transfieren de una bacteria a otra a través de la conjugación. (Pérez y Mota, 2006) (FAO, 2016)

Transposones: Son cadenas cortas de ADN que saltan de cromosoma a plásmido o entre plásmidos, luego de lo cual se integran a las cadenas de ADN diferentes de la que provienen, los transposones no son autorreplicables. (FAO, 2016)

1.12 Antibiograma

Los antibiogramas son métodos *in vitro* que permiten determinar si la bacteria presenta resistencia o sensibilidad frente a varios antimicrobianos, para lo cual se usan discos de papel impregnados con antibióticos los cuales se colocan en una placa Petri inoculada con la cepa bacteriana como se indica en la figura 17-1. (Granados y Villaverde, 2003: p.151) (Pedrique, 2002) (Manual de actualización en resistencia bacteriana y normas CLSI M100-S20, 2010, p.8)

Si la bacteria es sensible al antibiótico se produce un halo de inhibición de crecimiento caso contrario no habrá formación de halo. Por otro lado el antibiograma sirve también para que se pueda orientar las decisiones terapéuticas individuales y realizar un seguimiento epidemiológico de las resistencias bacterianas. (Manual de actualización en resistencia bacteriana y normas CLSI M100-S20, 2010, p.12)

Cabe mencionar además que dos de las técnicas que se utilizan para determinar la susceptibilidad antimicrobiana son la del método de difusión en disco con la técnica de Kirby-Bauer y el método de micro y macrodilución en caldo y agar. Para que los resultados obtenidos sean fiables las técnicas, los medios de cultivo y los procedimientos deben estar normalizados. (Pronadisa, 1960)

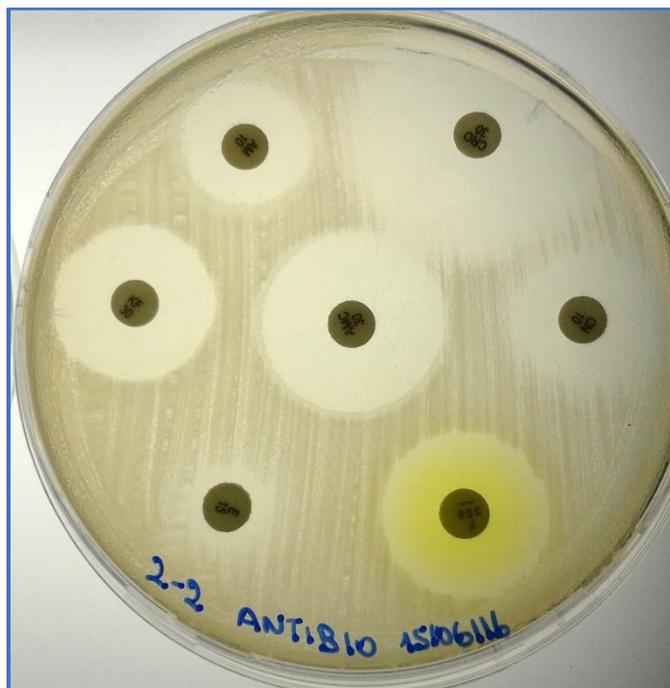


Figura 17-1: Antibiograma de la cepa 2-2 aislada del Balneario El Cachaco

Realizado por: CORTES Sandra, 2016

1.12.1 Discos para el antibiograma

Son elaborados por casa comerciales, contienen una concentración determinada del antibiótico que permite que exista una correlación semejante a la concentración mínima inhibitoria que este antibiótico alcanza in vivo, de acuerdo a los resultados de resistencia o susceptibilidad. (Bernal y Guzmán, 1984, pp. 112-113)

Se mantienen en refrigeración a 4°C excepto los derivados betalactámicos que se almacenan a -20°C, en una caja Petri se colocan de 6 a 8 discos. (Bernal y Guzmán, 1984, p. 113)

Los discos para un antibiograma se pueden seleccionar en dependencia de que los microorganismos sean Gram positivos y Gram negativos, dentro de los últimos si son aislados del tracto urinario o si se trata de *Pseudomonas aeruginosa* como se indica en la tabla 13-1 y 14-1. (Bernal y Guzmán, 1984, p. 114)

También su selección depende de cada laboratorio clínico en sugerencia con el medico encargado de las enfermedades infecciosas y el comité de control de la infección, los antibióticos que se encuentran contemplados en la tabla 15-1 del *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) son de eficacia clínica comprobada para varios microorganismos. (Álvarez, 1995, p.228)

Tabla 13-1: Guía para la selección de antimicrobianos para el antibiograma.

OPCION	GRAM NEGATIVOS				GRAM POSITIVOS		
	INTESTINAL	URINARIA	SANGRE TEJIDOS	<i>Ps.</i> <i>aeruginosa</i>	Staphylococcus	Streptococcus faecalis (D)	OTROS
PRIMERA	Ampicilina	Acido oxolinico	Amikacina	Carbenicilina	Penicilina G.	Ampicilina	Ampicilina
	Gentamicina	Acido nalidixico	Ampicilina	Amikacina	Oxacilina	Cloranfenicol	Penicilina G
	Cloranfenicol	Norfloxacina	Gentamicina	Gentamicina	Eritromicina	Tetraciclina	Oxacilina
	Trimetoprim-Sulfa	Nitrofurantoina	Cloranfenicol	Tobramicina	Cloranfenicol	Eritromicina	Clindamicina
	Tetraciclina	Sulfisoxazole	Cefamandole	Polimixina B	Clindamicina*	Penicilina G	Eritromicina
	Trimetoprim-Sulfa	Trimetoprim-Sulfa				Tetraciclina	
SEGUNDA		Ampicilina	Cefoxitina	Colistina	Gentamicina		Gentamicina
		Cloranfenicol	Cefotaxima		Netilmicina		Trimetoprim-Sulfa
		Gentamicina	Kanamicina		Vancomicina		Cloranfenicol

Fuente: BERNAL Y GUZMÁN, 1984

Tabla 14-1: Batería de discos recomendados para los antibiogramas de rutina en laboratorios clínicos

GRAM POSITIVOS	GRAM NEGATIVOS	ORINAS
Ampicilina	Ampicilina	Ampicilina
Carbenicilina	Carbenicilina	Ácido nalidíxico
Cefalotina	Cefalotina	Carbenicilina
Cloranfenicol	Cloranfenicol	Cefalotina
Eritromicina	Colimicina	Cloranfenicol
Gentamicina	Estreptomina	Colimicina
Kanamicina	Gentamicina	Furadantina
Lincomicina	Kanamicina	Gentamicina
Meticilina/Oxacilina	Neomicina	Kanamicina
Penicilina G	Rifampicina	Sulfonamida
Tetraciclina	Sulfonamida	SXT
Vancomicina	Tetraciclina	Tetraciclina

Fuente: GRANADOS Y VILLAVERDE, 2003

Tabla 15-1: Grupos de antimicrobianos que deberían ser incluidos en las pruebas de sensibilidad de los laboratorios clínicos según NCCLS.

<i>Enterobacteriaceae y Acinetobacter</i>	<i>Pseudomonas y Acinetobacter</i>	<i>Staphylococcus</i>	Enterococo	<i>Streptococcus</i> distinto de enterococo
Amikacina	Amikacina	Amikacina o	Penicilina G o	Cefalotina
Ampicilina	Azlocilina o	Gentamicina o	Ampicilina	Cloranfenicol
Amoxicilina + Ac. clavulánico	Piperacilina	Kanamicina o	Vancomicina	Clindamicina
Aztreonam o	Aztreonam	Netilmicina o	-----	Eritromicina
Cefotaxima o	Carbenicilina o	Tobramicina	Eritromicina	Penicilina G
Ceftazidima o	Mezlocilina o	Amoxicilina + Ac. clavulánico	Nitrofurantoina	Tetraciclina
Ceftioxima o	Ticarcilina	Cefalotina	Norfloxacina	Vancomicina
Ceftriaxona o	Cefoperazona o	Clindamicina	Tetraciclina	-----
Moxalactam	Ceftazidima	Cotrimoxazol	-----	Nitrofurantoina
Carbenicilina o	Cefotaxima o	Eritromicina	-----	Norfloxacina
Ticarcilina	Ceftriaxona o	Imipenem	-----	-----
Cefalctina	Moxalactam	Meclilina o	-----	-----
Cefamandol o	Cloranfenicol	Nalclina o	-----	-----
Cefonicida o	Cotrimoxazol	Oxacilina	-----	-----
Cefuroxima	Gentamicina	Penicilina G	-----	-----
Cefazolina	Imipenem	Tetraciclina	-----	-----
Cefoperazona	Cotrimoxazol	Vancomicina	-----	-----
Cefoxitina	Netilmicina	-----	-----	-----
Cloranfenicol	Tobramicina	-----	-----	-----
Cotrimoxazol	-----	-----	-----	-----
Gentamicina	Ceftioxima	Cotrimoxazol	-----	-----
Imipenem	Cotrimoxazol	Nitrofurantoina	-----	-----
Kanamicina	Norfloxacina	Norfloxacina	-----	-----
Mezlocilina o	Sulfisoxazol	Sulfisoxazol	-----	-----
Piperacilina	Tetraciclina	Trimetoprim	-----	-----
Netilmicina	-----	-----	-----	-----
Tetraciclina	-----	-----	-----	-----
Tobramicina	-----	-----	-----	-----
-----	-----	-----	-----	-----
Cinoxacina o	-----	-----	-----	-----
Ácido nalidíxico	-----	-----	-----	-----
Cotrimoxazol	-----	-----	-----	-----
Nitrofurantoina	-----	-----	-----	-----
Norfloxacina	-----	-----	-----	-----
Sulfisoxazol	-----	-----	-----	-----
Trimetoprim	-----	-----	-----	-----

Fuente: ALVAREZ, 1995

Algunos de los discos utilizados para pruebas específicas de diferenciación bacteriana son los siguientes:

- **Discos de Ácido nalidíxico**

Los discos impregnados con ácido nalidíxico a una concentración de 30ug bloquean la replicación del ADN bacteriano por tanto se inhibe el crecimiento de las bacterias Gram negativas y de *Staphylococcus epidermidis*; en cambio el *Staphylococcus saprophyticus* es resistente a este disco. (Wikipedia, 2016)

El ácido nalidíxico es un bacteriostático que a concentraciones elevadas actúa como bactericida, se lo utiliza para tratar infecciones urinarias producidas por *Escherichia coli*, *Proteus*, *Shigella*, *Enterobacter* y *Klebsiella*. Un microorganismo es sensible si existe cualquier zona de inhibición. (Wikipedia, 2016)

- **Discos de Optoquina**

Discos impregnados de solución acuosa de clorhidrato de etilhidrocupreína, el medicamento optoquina a una concentración de 5ug/mL o menos inhibe el crecimiento de *Streptococcus pneumoniae* originando un halo de inhibición del crecimiento bacteriano de 14mm de diámetro, no así para otras especies de *Streptococcus* alfa-hemolíticos en donde no se presentan halos de inhibición alrededor del disco o estos son de un diámetro menor a 14mm. (Winn, 2006, p.684) (Fernández, 2010, p.8) (Laboratorios Britania S.A. 2012)

Según Álvarez y Boquet (1995, p. 134) consideran que la medida de los halos debe ser 15mm para diferenciar un microorganismo entre sensible o resistente.

Se reporta como *Streptococcus pneumoniae* a las colonias alfa hemolíticas, cocos Gram positivos en pares, catalasa negativa y sensibles a optoquina; se reporta como estreptococos del grupo viridans cuando se tratan de cocos Gram positivos, en pareja, alfa hemolítico, resistentes a la optoquina y catalasa negativo como se muestra en la figura 18-1. (Laboratorios Britania S.A. 2012) (Álvarez, 1995, p. 134)



Figura 18-1: Resultados de la prueba de optoquina

Fuente: ARANGUREN, 2014

- **Discos de Bacitracina**

Discos impregnados de una solución de bacitracina 0.04 U, permiten identificar el *Streptococcus* beta hemolítico del grupo A de Lancefield o *Streptococcus pyogenes* pues este es sensible a este medicamento al contrario de otras especies de *Streptococcus*. La bacitracina inhibe la síntesis de la pared celular de la bacteria. (Winn, 2006, pp.680-682) (Fernández, 2010, p.8) (Álvarez, 1995, p.113)

El estreptococo grupo A muestra sensibilidad a la bacitracina, los *Micrococcus* son inhibidos por el medicamento por otro lado los estafilococos coagulasa negativa son resistentes. (Fernández, 2010, p.8)

Algunos autores mencionan que una cepa es sensible cuando hay presencia de halo de inhibición independiente del diámetro de la misma y es resistente si no presenta halo de inhibición alrededor del disco de bacitracina lo cual se debe reportar como estreptococo beta hemolítico que presuntivamente no pertenece al grupo A, como se indica en la figura 19-1. (Álvarez, 1995, p.113)

Otros autores mencionan que una zona de inhibición mayor o igual a 14mm de diámetro se considera como sensible y una zona de inhibición menor a 14mm de diámetro es resistente. (Laboratorios W. Brizuela. S.A., 2015)



Figura 19-1: Resultados de la prueba de bacitracina

Fuente: ARANGUREN, 2014

- **Discos de Novobiocina**

Discos impregnados de una solución de novobiocina 5ug que permiten identificar al *Staphylococcus epidermidis* pues este es sensible al antibiótico como se muestra en la figura 20-1. (Álvarez, 1995, p.133)

El *Staphylococcus saprophyticus* es resistente con un halo de inhibición de 6 a 12mm, el *Staphylococcus aureus* es sensible con un halo mayor o igual a 16mm. (Álvarez, 1995, pp.133-134)

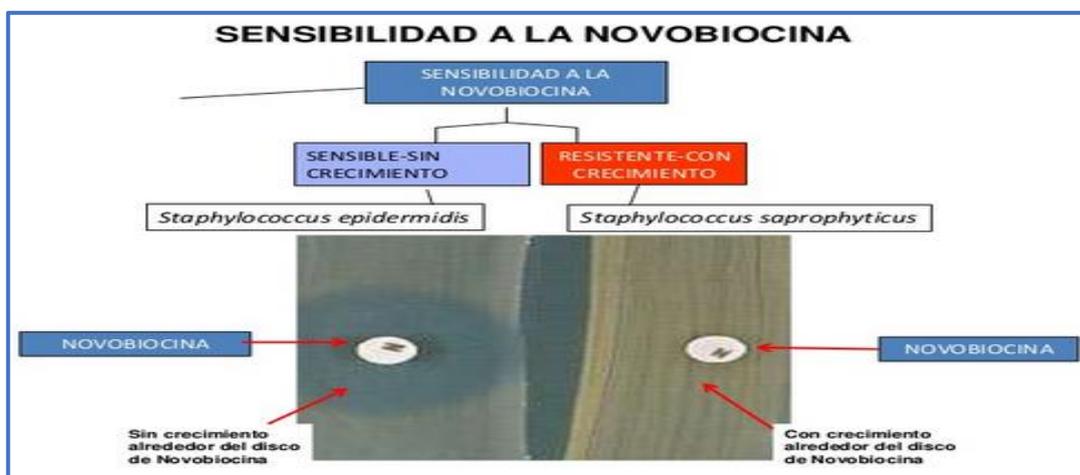


Figura 20-1: Prueba de la novobiocina

Fuente: ARANGUREN, 2014

Los discos básicos que pueden ser utilizados como representantes de cada uno de los grupos de antibióticos son los que se indican en la tabla 16-1.

Tabla 16-1: Discos básicos que representan cada grupo de antibióticos.

Antibióticos	Concentración de los discos	Antibiótico(s) Representado(s)
Amikacina	10 mcg	Amikacina
Ampicilina	10 mcg	Género de Ampicilina (Ampicilina, Hetacilina)
Bacitracina	10 units	Bacitracina
Carbenicilina	50 mcg*	Carbenicilina
Cefalotina	30 mcg	Grupo de las Cefalosporinas (Cefalotina, Cefalexina, Cefaloglicina, Cefaloridina)
Cloranfenicol	30 mcg	Cloranfenicol
Clindamicina	2 mcg	Lincomicina, Clindamicina
Colistina	10 mcg	Colistina (Colimicina)
Eritromicina	15 mcg	Eritromicina
Gentamicina	10 mcg	Gentamicina
Kanamicina	30 mcg	Kanamicina
Metilicina	5 mcg	Penicilinas resistentes a la Penicilinas (Penicilina G, Fenoximetil-Penicilina, Feneticilina)
Neomicina	30 mcg	Neomicina
Novobiocina	30 mcg	Novobiocina
Oleandomicina	15 mcg	Oleandomicina (Oleandomicina, Trioleandomicina)
Penicilina G	10 units	Penicilina, Feneticilina
Polimixina B	300 units	Polimixina B
Rifampina	5 mcg	Rifampina
Estreptomycin	10 mcg	Estreptomycin, Dihidroestreptomycin
Tetraciclina	30 mcg	Grupo de la Tetraciclina (Tetraciclina, Oxitetraciclina, Metaciclina, Doxiciclina, Demeclociclina, Minociclina, Rolitetraciclina, Clortetraciclina)
Tobramicina	10 mcg	Tobramicina
Vancomicina	30 mcg	Vancomicina

Fuente: ALVAREZ, 1995

1.12.2 Método de difusión en agar según Kirby Bauer

Método usado de manera rutinaria para bacterias de crecimiento rápido y algunas patógenas, está recomendado por el *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) para poder determinar la sensibilidad de un microorganismo frente a los antimicrobianos. (Pedrique, 2002) (Procedimientos en Microbiología Clínica, 2000)

Consiste en colocar discos de papel impregnados con antibióticos sobre la superficie de una caja Petri con agar Mueller Hinton, que ha sido inoculada con un microorganismo cuya densidad se ha igualado al estándar de turbidez de 0.5 de McFarland. (Procedimientos en Microbiología Clínica, 2000)

El antibiótico se difunde en el agar y forma un gradiente de concentración, luego de 18 a 24 horas de incubación a 35-37°C, alrededor del disco puede o no generarse halos de inhibición de crecimiento del microorganismo inoculado. (Procedimientos en Microbiología Clínica, 2000)

1.12.3 Medición de los halos de inhibición

La concentración mínima inhibitoria (CMI) es la base de la medida de la sensibilidad de un microorganismo a un antibiótico, esta se define como la menor concentración de una serie de diluciones de antibiótico que causa una inhibición del desarrollo de la bacteria en condiciones normalizadas. (Cercenado y Saavedra, 2009)

La CMI es el valor de referencia que permite establecer una escala de la actividad del antibiótico frente a la bacteria en sensible, intermedia y resistente, los puntos de corte son los que separan estas categorías, la zona de inhibición se relaciona de manera inversa con la CMI es así que un valor bajo de CMI puede indicar mayor actividad del antibiótico pero esto depende de la especie de la bacteria y de cada antibiótico. (Cercenado y Saavedra, 2009)

La zona de inhibición de un disco se mide con una regla contra una superficie oscura bajo luz reflejada, en la medición del diámetro de la zona se debe incluir los 6mm del disco. La efectividad de los discos se evalúan consultando la tabla en la que de acuerdo al antibiótico, tenemos la capacidad de difusión en el medio y por tanto la medida del halo que se clasifica en sensible, intermedia o resistente. (Bernal y Guzmán, 1984, p.117)

Existen factores que afectan el halo de inhibición como son la concentración del antibiótico en el disco, la difusión del antibiótico en el medio, el tamaño del inóculo de la bacteria, la composición y grosor del medio de cultivo, la velocidad de crecimiento bacteriano y el tiempo en el que incuba. (Bernal y Guzmán, 1984, p.117)

1.12.4 Interpretación de los resultados

El diámetro del área de inhibición alrededor del disco o valores de CMI, puede clasificarse en tres categorías de acuerdo a las tablas que han publicado los organismos encargados del control de estos procedimientos como el *Clinical and Laboratory Standards Institute* en Estados Unidos entre otros, que establecen puntos de corte en base a las propiedades microbiológicas, farmacocinéticas y eficacia clínica de cada antibiótico, como sigue a continuación: (Cercenado y Saavedra, 2009) (Pedrique, 2002)

- **Susceptible:** Si el microorganismo es inhibido in vitro por el antibiótico a una dosis adecuada, lo cual indica que existe alta probabilidad de éxito terapéutico de la infección a una dosis habitual del antibiótico. (Manual de actualización en resistencia bacteriana y normas CLSI M100-S20, 2010, p.12)
- **Intermedia:** El microorganismo presenta una concentración mínima inhibitoria del antibiótico próxima a los niveles del mismo en sangre o tejidos en donde su respuesta puede ser más baja que en las cepas susceptibles, lo cual implica que el antibiótico sea eficaz en partes del cuerpo donde este es concentrado de manera fisiológica o cuando se puedan emplear dosis que sobrepasen de la normal, el éxito terapéutico es imprevisible. (Granados y Villaverde, 2003: p.151) (Manual de actualización en resistencia bacteriana y normas CLSI M100-S20, 2010, p.12)
- **Resistente:** El microorganismo no es inhibido in vitro por el antibiótico en concentraciones séricas alcanzadas en una dosis normal, la posibilidad de éxito terapéutico es reducido o nulo. (Manual de actualización en resistencia bacteriana y normas CLSI M100-S20, 2010, p.12)

A continuación se presentan la tabla 17-1 de interpretación de la relación del diámetro del halo de inhibición con la susceptibilidad del microorganismo frente al antimicrobiano según la NCCLS.

Tabla 17-1: Diámetro de las zonas patrón y su equivalencia con los puntos de ruptura de la concentración mínima de antimicrobianos que inhiben el crecimiento bacteriano.

Agente antimicrobiano	Contenido del disco	Resistente	Diámetro interpretativo (mm.)			Equivalente al punto de ruptura de CMI	
			Moderadamente Intermedio	Sensible	Sensible	Resistente	Sensible
Amikacina	30 µg.	<< 14	15-16	—	> 17	> 32 µg/ml.	< 16 µg/ml.
Amoxicilina/ácido clavulánico							
Para <i>Haemophilus</i> y <i>Staphylococcus</i>	20/10 µg.	<< 19	—	—	> 20	—	< 4/2 µg/ml.
Para otros microorganismos	20/10 µg.	<< 13	14-17	—	> 18	> 32/16 µg/ml.	< 8/4 µg/ml.

Fuente: ALVAREZ, 1995

Agente antimicrobiano	Contenido del disco	Resistente	Diámetro interpretativo (mm)			Equivalente al punto de ruptura de CMI	
			Moderadamente			Resistente	Sensible
			Intermedio	Sensible	Sensible		
Ampicilina para gramnegativos entéricos	10 µg.	<<11	12-13	—	>>14	>>32 µg/ml.	<<8 µg/ml.
Para <i>Staphylococcus</i>	10 µg.	<<28	—	—	>>29	β-lactamasa	<<0,25 µg/ml.
Para <i>Haemophilus</i> .	10 µg.	<<19	—	—	>>20	>>4 µg/ml.	<<2 µg/ml.
Para enterococo.	10 µg.	<<16	—	>>17	—	>>16 µg/ml.	—
Para otros estreptococos y <i>Listeria monocytogenes</i>	10 µg.	<<21	—	22-29	>>30	>>4 µg/ml.	<<0,12 µg/ml.
Azlocilina para <i>Pseudomonas</i>	75 µg.	<<14	15-17	—	>>18	>>256 µg/ml.	<<64 µg/ml.
Aztreonam	30 µg.	<<15	—	16-21	>>22	>>32 µg/ml.	<<8 µg/ml.
Carbenicilina							
Para <i>Enterobacteriaceae</i>	100 µg.	<<17	18-22	—	>>23	>>32 µg/ml.	<<16 µg/ml.
Para <i>Pseudomonas</i>	100 µg.	<<13	14-16	—	>>17	>>512 µg/ml.	<<128 µg/ml.
Cefalotina	30 µg.	<<14	15-17	—	>>18	>>32 µg/ml.	<<8 µg/ml.
Cefamandol	30 µg.	<<14	15-17	—	>>18	>>32 µg/ml.	<<8 µg/ml.
Cefazolina	30 µg.	<<14	15-17	—	>>18	>>32 µg/ml.	<<8 µg/ml.
Cefonicid	30 µg.	<<14	15-17	—	>>18	>>32 µg/ml.	<<8 µg/ml.
Cefoperazona	75 µg.	<<15	—	16-20	>>21	>>64 µg/ml.	<<16 µg/ml.
Cefotaxima	30 µg.	<<14	—	15-22	>>23	>>64 µg/ml.	<<8 µg/ml.
Cefotetán	30 µg.	<<12	—	13-15	>>16	>>64 µg/ml.	<<16 µg/ml.
Cefoxitina	30 µg.	<<14	—	15-17	>>18	>>32 µg/ml.	<<8 µg/ml.
Ceftazidima	30 µg.	<<14	15-17	—	>>18	>>32 µg/ml.	<<8 µg/ml.
Ceftizoxima para aislados urinarios de <i>P. aeruginosa</i>	30 µg.	<<10	—	>>11	—	>>64 µg/ml.	—
Para otros organismos	30 µg.	<<14	—	15-19	>>20	>>32 µg/ml.	<<8 µg/ml.
Ceftriaxona	30 µg.	<<13	—	14-20	>>21	>>64 µg/ml.	<<8 µg/ml.
Cefuroxima	30 µg.	<<14	15-17	—	>>18	>>32 µg/ml.	<<8 µg/ml.
Cloranfenicol	30 µg.	<<12	13-17	—	>>18	>>25 µg/ml.	<<12,5 µg/ml.
Cinoxacina	100 µg.	<<14	15-18	—	>>19	>>64 µg/ml.	<<16 µg/ml.
Clindamicina	2 µg.	<<14	15-16	—	>>17	>>2 µg/ml.	<<1 µg/ml.
Doxiciclina	30 µg.	<<12	13-15	—	>>16	>>16 µg/ml.	<<4 µg/ml.
Eritromicina	15 µg.	<<13	14-17	—	>>18	>>8 µg/ml.	<<2 µg/ml.
Estreptomina	10 µg.	<<11	12-14	—	>>15	—	—
Gentamicina	10 µg.	<<12	13-14	—	>>15	>>8 µg/ml.	<<4 µg/ml.
Imipenem	10 µg.	<<13	14-15	—	>>16	>>16 µg/ml.	<<4 µg/ml.
Kanamicina	30 µg.	<<13	14-17	—	>>18	>>25 µg/ml.	<<6 µg/ml.
Meticilina para <i>Staphylococcus</i>	5 µg.	<<9	10-13	—	>>14	—	<<3 µg/ml.
Mezlocilina	75 µg.	<<12	13-15	—	>>16	>>256 µg/ml.	<<64 µg/ml.
Minociclina	30 µg.	<<14	15-18	—	>>19	>>16 µg/ml.	<<4 µg/ml.
Moxalactam	30 µg.	<<14	—	15-22	>>23	>>64 µg/ml.	<<8 µg/ml.
Nafcilina para <i>Staphylococcus</i>	1 µg.	<<10	11-12	—	>>13	—	<<1 µg/ml.
Acido nalidixico	30 µg.	<<13	14-18	—	>>19	>>32 µg/ml.	<<8 µg/ml.
Netilmicina	30 µg.	<<12	13-14	—	>>15	>>32 µg/ml.	<<12 µg/ml.
Nitrofurantoina	300 µg.	<<14	15-16	—	>>17	>>100 µg/ml.	<<25 µg/ml.
Norfloxacina	10 µg.	<<12	13-16	—	>>17	>>16 µg/ml.	<<4 µg/ml.
Oxacilina							
Para <i>Staphylococcus</i>	1 µg.	<<10	11-12	—	>>13	—	<<1 µg/ml.
Para probar la sensibilidad del neumococo a la penicilina	1 µg.	<<19	—	—	>>20	—	<<0,06 µg/ml.
Penicilina G							
Para <i>Staphylococcus</i>	10 unidades	<<28	—	—	>>29	β-lactamasa	>>0,1 µg/ml.
Para <i>N. gonorrhoeae</i>	10 unidades	<<19	—	—	>>20	β-lactamasa	>>0,1 µg/ml.
Para enterococo	10 unidades	<<14	—	>>15	—	>>16 µg/ml.	—
Para otros estreptococos y <i>L. monocytogenes</i>	10 unidades	<<19	—	20-27	>>28	>>4 µg/ml.	<<0,12 µg/ml.
Piperacilina	100 µg.	<<14	15-17	—	>>18	>>256 µg/ml.	<<64 µg/ml.
Sulfonamidas	250 ó 300 µg.	<<12	13-16	—	>>17	>>350 µg/ml.	<<100 µg/ml.
Tetraciclina	30 µg.	<<14	15-18	—	>>19	>>16 µg/ml.	<<4 µg/ml.
Ticarclina	75 µg.	<<11	12-14	—	>>15	>>128 µg/ml.	<<64 µg/ml.
Ticarcilina/ácido clavulánico	75/10 µg.	<<11	12-14	—	>>15	>>128/2 µg/ml.	<<64/2 µg/ml.
Tobramicina	10 µg.	<<12	13-14	—	>>15	>>8 µg/ml.	<<4 µg/ml.
Trimetoprim	5 µg.	<<10	11-15	—	>>16	>>16 µg/ml.	<<4 µg/ml.
Trimetoprim/sulfametoxazol	1,25/23,75 µg.	<<10	11-15	—	>>16	>>8/152 µg/ml.	<<2/36 µg/ml.
Vancomicina	30 µg.	<<9	10-11	—	>>12	—	<<5 µg/ml.

Fuente: ALVAREZ, 1995

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1 Lugar de investigación

La presente investigación se llevó a cabo en las aguas termales del Balneario El Cachaco, ubicado en la parroquia de Calacalí perteneciente a la provincia de Pichincha.

Las muestras de agua termal se recolectaron en varios sitios del Balneario El Cachaco como fueron la vertiente pequeña (M1), punto 1 de surgencia del agua (M2), piscina parte frontal (M3), punto 2 de surgencia del agua (M4) y piscina alado de las gradas (M5) como se indican en los gráficos que siguen, en donde además se midieron los parámetros físico-químicos pH y temperatura.



Figura 1-2: Vertiente pequeña (M1)

Realizado por: CORTES Sandra, 2016



Figura 2-2: Punto 1 de surgencia del agua (M2)

Realizado por: CORTES Sandra, 2016



Figura 3-2: Piscina parte frontal (M3)

Realizado por: CORTES Sandra, 2016



Figura 4-2: Punto 2 de surgencia del agua (M4)

Realizado por: CORTES Sandra, 2016

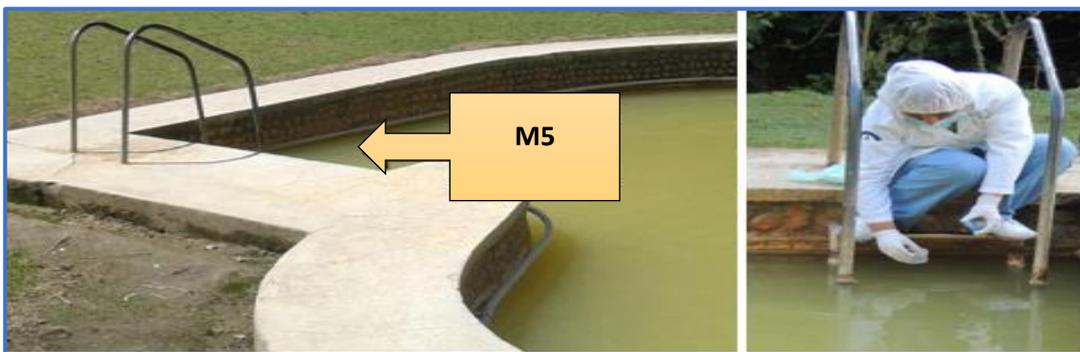


Figura 5-2: Piscina alado de las gradas (M5)

Realizado por: CORTES Sandra, 2016

La siembra de las muestras de agua termal, descripción macroscópica de las colonias, aislamiento de los microorganismos puros, tinción Gram, pruebas de identificación, análisis y reporte de resultados se llevaron a cabo en el laboratorio de Análisis Bioquímicos y Bacteriológicos de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH).

2.2 Tipo de estudio

Tomando en cuenta algunos aspectos del presente trabajo de investigación tenemos que:

- Según el enfoque el estudio fue cualitativo pues permitió describir las cualidades o características de los microorganismos aislados, además no se comprobó ninguna teoría o hipótesis.
- Según el alcance el estudio fue descriptivo pues permitió medir o evaluar diversos aspectos de las aguas termales y de los microorganismos encontrados en las mismas.
- Según la proyección el estudio fue prospectivo pues los datos fueron recogidos a medida que se fue realizando cada etapa de la investigación.
- Según el número de veces que se mide la variable el estudio fue transversal pues no se realizará un seguimiento posterior a esta investigación. (Martínez, 2011)
- Según el control de la variable el estudio fue observacional pues el investigador no controló los factores de estudio sino que únicamente se observó, se midió y analizó cada uno de los resultados obtenidos.

2.3 Población

La población de estudio fue los manantiales de agua termal del Balneario El Cachaco ubicado en la parroquia Calacalí provincia de Pichincha.

2.4 Muestra

Como se mencionó anteriormente se tomaron 5 muestras de varios sitios del Balneario El Cachaco que se muestran en las figuras 1, 2, 3, 4 y 5.

Los criterios de inclusión que se tomó en cuenta fueron:

- El agua termal provenga de sitios representativos como los puntos de surgencia del agua, una vertiente y de la piscina.
- El agua termal sea recolectada lo más cercano posible al punto donde emerge en el caso del origen o de la vertiente y de la piscina en el lugar en donde se considera que existe más contaminación.

2.5 Tamaño de la muestra

Se realizaron dos muestreos en el Balneario El Cachaco durante el presente estudio microbiológico, el volumen de cada muestra fue de aproximadamente 150 mililitros de agua termal.

2.6 Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Las técnicas e instrumentos utilizados para la recolección de los datos del estudio microbiológico de las aguas termales del Balneario El Cachaco fueron:

- La medición in situ de los parámetros físico-químicos del agua termal con ayuda de las tirillas de pH y de un termómetro de 360°C.

- La observación del crecimiento de las diferentes cepas de microorganismos en los agares y de los resultados que se dieron al realizar las pruebas de identificación.
- La observación con ayuda del microscopio óptico para determinar la morfología de cada microorganismo y el tipo de tinción Gram.
- La medición de los halos de inhibición del antibiograma realizado para cada microorganismo.
- Los datos obtenidos fueron registrados cada día en un diario de investigación.

2.7 Procesamiento y plan de análisis de datos

Para el procesamiento de los datos se ha utilizado el programa Microsoft Excel en el cual los resultados numéricos fueron ingresados y posteriormente se sacó el total, promedio, desviación estándar, varianza y porcentaje respectivamente.

2.8 Materiales, equipos y reactivos

Para el presente estudio microbiológico de las aguas termales del Balneario El Cachaco se utilizaron los materiales, equipos y reactivos que se detallan a continuación.

2.8.1 *Material biológico*

El material biológico fue el agua termal procedente de la vertiente pequeña (M1), punto 1 de surgencia del agua (M2), piscina parte frontal (M3), punto 2 de surgencia del agua (M4) y piscina alado de las gradas (M5) del balneario El Cachaco.

2.8.2 *Material de Laboratorio*

Los materiales de laboratorio utilizados en la presente investigación fueron:

- Cajas Petri
- Frascos de plástico estériles
- Termómetro de 360°C
- Placas Petri
- Placas Petrifilm para Staph Express, aerobios totales, *Escherichia coli* y coliformes, mohos y levaduras (3M).
- Puntas plásticas azules
- Puntas plásticas amarillas (Citotest)
- Asa de platino
- Aguja de inoculación
- Asa de vidrio
- Pipeta Pasteur
- Pipeta graduada de 10mL
- Pipetas automáticas de 25uL, 500 (CLINIPET)
- Pipetas automáticas de 100uL y 1000uL (Accumax PRO)
- Porta objetos (Goldlab)
- Espátula
- Matraces Erlenmeyer de 250 y de 500mL
- Papel aluminio
- Gradilla
- Jeringuilla de 5mL
- Tubos de vidrio de tapa roja
- Tubos de vidrio pequeños
- Probeta de 250mL
- Varilla de agitación
- Pera de succión
- Vasos de precipitación de 100 y 250mL
- Pizeta
- Gotero de vidrio

- Mechero de alcohol
- Frascos de vidrio de 500mL
- Fundas plásticas negras
- Fundas plásticas rojas
- Dermo negro
- Cinta indicadora de esterilización
- Fundas resellables
- Guantes de nitrilo
- Mascarilla
- Gorro
- Hisopos
- Gasa
- Algodón
- Toallas de papel
- Limpión de tela
- Palillos de madera de cabeza redonda
- Pinza metálica
- Papel boon
- Cinta masking
- Parafilm (Laboratory Film)
- Cooler
- Aplicador plano 3M Petrifilm

2.8.3 Equipos

- Balanza analítica
- Reverbero eléctrico
- Cámara de flujo laminar (NUAIRE)
- Autoclave (Tuttnauer)
- Microscopio óptico (OLYMPUS CX31)
- Estufa bacteriológica (memmert)
- Refrigeradora (Indurama)

- Unidad de lectura con luz para aglutinación
- Centrífuga (Dynac III)

2.8.4 *Reactivos*

- Tiras de pH (Macherey-Nagel)
- Tiras de oxidasa (Hardy Diagnostics)
- Cloruro mercuríco HgCl_2 (MERCK)
- Glucosa monohidratada $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 - \text{H}_2\text{O}$ (MERK)
- Solución de yodo yodurado
- Ácido clorhídrico concentrado
- Agar base sangre (acumedia)
- Agar Hugh y Leifson (Difco)
- Agar Manitol Salado (HIMEDIA) (acumediaa9)
- Agar Eosina Azul de Metileno (acumedia)
- Agar Mueller Hinton (HIMEDIA)
- Agar *Salmonella-Shigella* (MERK)
- Agar Nutritivo (Difco)
- Agar MacConkey (Difco)
- Agar Simmons citrato (MERK)
- Agar Úrea (MERK)
- Agar Kligler (MERK)
- Agar SIM (MERK)
- Caldo tripticasa de soja (MERK)
- Almidón soluble (maicena)
- Gelatina para microbiología (MERK)
- Vaselina
- Cloruro de sodio (J.T.Baker)
- Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)
- Reactivo de Kovacs (Himedia)
- Lugol (Quimical)
- Alcohol cetona (Quimical)

- Safranina (Quimical)
- Cristal violeta (Quimical)
- Aceite de inmersión
- Suero fisiológico (Lamosan-FC)
- Discos de antibióticos: trimetoprima-sulfametoxazol 25ug, nitrofurantoina 300ug, ceftriaxona 30ug, amoxicilina + ácido clavulánico 30ug, gentamicina 10ug, imipenem 10ug, ampicilina 10ug, cefalotina 30ug, ciprofloxacina 5ug, eritromicina 15ug, penicilina 10U, oxacilina 1ug, novobiocina 5ug, ácido nalidíxico 30ug, bacitracina 0.04U, carbenicilina 100ug, kanamicina 30ug, tetraciclina 30ug, vancomicina 30ug, (Bioanalyse)
- Discos de antibióticos: optoquina 5ug, estreptomina 300ug(Oxoid)
- Agua destilada (Alcoholimex)
- TEGO 1%

2.9 Métodos y Técnicas

2.9.1 Muestreo

Como se indicó se realizaron dos muestreos en los mismos sitios del balneario mencionados anteriormente, el uno cuando no hubo presencia de bañistas en las aguas termales y el otro cuando si los hubo.

2.9.2 Recolección de la muestra

Las muestras de agua termal fueron colectadas en recipientes de plástico estéril de acuerdo al siguiente protocolo:

- Abrir el frasco de plástico estéril de boca ancha cerca del punto donde se va a tomar la muestra, teniendo cuidado de no tocar ni la boca ni el interior del recipiente.

- Se lavó el recipiente por dos ocasiones con la misma agua termal del punto de muestreo.
- Colocar el frasco formando un ángulo de 45° con la horizontal, sumergirlo en el agua termal en dirección contra corriente hasta que se llene las tres cuartas partes del mismo.
- Tapar inmediatamente el frasco dejando un espacio de aire luego de colocar la tapa y con un pedazo de parafilm sellar la tapa para que no se riegue la muestra. (NTE INEN 2169:1998) (NTE INEN 2176:1998) (Guevara, 1996, p.10) (Huacan, 2014)

2.9.3 Identificación de las muestras

Los recipientes de plástico con las muestras fueron etiquetados luego de la recolección para así evitar errores de identificación.

Además en una libreta de apuntes se tomó en cuenta los siguientes datos:

- Localización del sitio de muestreo
- Detalles del punto de muestreo
- Fecha de recolección
- Hora de recolección
- Nombre del recolector
- Método de recolección
- Condiciones atmosféricas
- Tipo de análisis que se va a realizar
- Datos recogidos de campo (NTE INEN 2169:1998) (NTE INEN 2176:1998)

2.9.4 Análisis físico-químico in situ del agua termal

El presente estudio microbiológico contemplaba la medición de algunos parámetros físico-químicos in situ, la temperatura del agua termal y la temperatura ambiente fueron determinadas con ayuda de un termómetro de mercurio, en cambio el pH fue medido por medio de unas tiras reactivas.

2.9.5 Transporte de las muestras

Las muestras fueron transportadas desde el Balneario hasta el laboratorio de Análisis Bioquímicos y Bacteriológicos de la Facultad de Ciencias-ESPOCH, dentro del Cooler a una temperatura cercana al sitio de recolección, protegida de la luz y de cualquier contaminación. (NTE INEN 2169:2998)

2.9.6 Análisis de laboratorio

Todos los análisis microbiológicos fueron realizados antes de que transcurran 48 horas desde la recolección de la muestra, dentro de una cámara de flujo laminar estéril, para lo cual esta se desinfectó con una solución de TEGO 1% y posteriormente se encendió la luz UV durante 20 minutos.

2.9.6.1 Siembra de las muestras de agua termal en placas 3M Petrifilm para el recuento rápido de Aerobios, recuento de Escherichia coli y Coliformes, sistema de recuento Staph Express, recuento de mohos y levaduras.

La funda de placas 3M Petrifilm fue sacada del refrigerador y colocada dentro de la cámara de flujo laminar hasta que alcance la temperatura ambiente.

Inoculación de placas 3M Petrifilm

La inoculación en placas Petrifilm se realizó con el siguiente procedimiento:

- Con el mechero de alcohol encendido se cortó por un lado del empaque y se sacó la placa Petrifilm.
- La placa 3M Petrifilm se colocó en una superficie plana dentro de la cámara de flujo laminar.
- En un extremo superior de la placa Petrifilm se identificó la procedencia y el número de la muestra que fue inoculada.
- Se levantó la película superior y con ayuda de una pipeta automática ubicada de manera perpendicular al Petrifilm se añadió 1mL de la muestra de agua termal en el centro de la película inferior.
- Se bajó la película superior con mucho cuidado para que la muestra no se derrame por los bordes y que no se formen burbujas en el Petrifilm.
- En el centro de la placa se colocó el aplicador plano 3M Petrifilm con la cara lisa hacia arriba y se ejerció presión suave sobre el mismo, para que de esta manera se distribuya la muestra de forma homogénea por la zona circular de la placa, no se debe girar ni deslizar el aplicador sino mantenerlo estable.
- Se retiró el aplicador y se esperó un minuto hasta que el gel se solidifique. (3M MEXICO, 2004) (3M, 2006a) (3M ESPAÑA S.A., 2002) (3M, 2006b)

Incubación de placas 3M Petrifilm

La incubación se realizó de la siguiente manera:

- Se colocaron las placas Petrifilm 3M en pila de 10 con la cara transparente hacia arriba y se llevaron a la estufa bacteriológica.
- Las placas Petrifilm de aerobios se incubaron durante 24 horas a una temperatura de 35°C, las placas Petrifilm de *Escherichia coli* y coliformes se incubaron durante 24 a 48 horas a 35°C, las placas Petrifilm Staph Express se incubaron por 24 horas a 35°C, las placas Petrifilm de mohos y levaduras se incubaron durante 48 horas a una temperatura de 25 a 28°C, sin embargo algunas colonias necesitaron más tiempo para crecer por lo cual el tiempo de incubación de la placa varía dependiendo del crecimiento de la colonia. (3M MEXICO, 2004) (3M, 2006a) (3M ESPAÑA S.A., 2002) (3M, 2006b)

Interpretación de los resultados de las placas 3M Petrifilm

Para la interpretación se realizó lo siguiente:

- La placa 3M Petrifilm se colocó sobre una fuente de luz y se contó las colonias crecidas dentro del área inoculada independientemente del tamaño, forma o color que posean.
- Se realizó la lectura de cada placa Petrifilm tomando en cuenta que:

En la placa 3M Petrifilm para aerobios se contaron las colonias de color rojo y azul. (3M MEXICO, 2004)

En la placa Petrifilm de *Escherichia coli* y Coliformes se contaron las colonias rojas o azules con o sin gas, además se tomó en cuenta que una placa de fondo azul-púrpura indica elevadas concentraciones de *Escherichia coli*, en cambio una placa de fondo rojo oscuro indica elevadas concentraciones de Coliformes y si el fondo de la placa es de color amarillo indica altas concentraciones de no-Coliformes. (3M, 2006a) (3M MEXICO, 2006)

En la placa Petrifilm Staph Express las colonias rojo-violeta se contaron como *Staphylococcus aureus*, las colonias de color azul-verde se contaron como no son *S. aureus* y las de color negro que pueden ser o no *S. aureus*. (3M ESPAÑA S.A., 2002)

En la placa Petrifilm de mohos y levaduras se contaron como levaduras las colonias pequeñas, de borde definido, elevadas, de color canela rosado a verde azulado en cambio se contaron como mohos las colonias grandes, de bordes difusos, color verde azulado, planas y de centro oscuro. (3M, 2006b)

- Los resultados se reportaron en UFC/mL.

A continuación en la figura 6-2 se indica el proceso de siembra de las muestras de agua termal en las placas 3M Petrifilm para el recuento rápido de Aerobios, recuento de *Escherichia coli* y Coliformes, sistema de recuento Staph Express, recuento de mohos y levaduras.

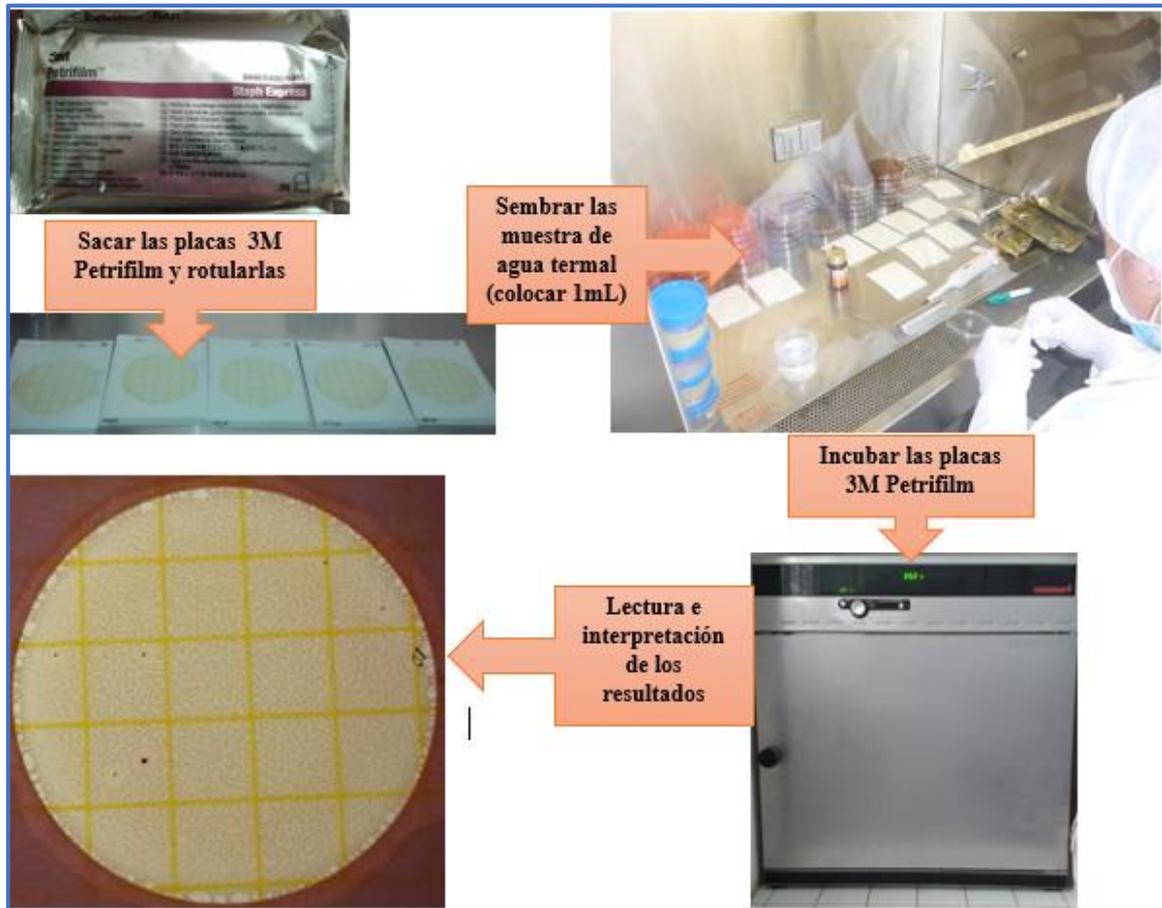


Figura 6-2: Siembra en placas 3M Petrifilm.

Realizado por: CORTES Sandra, 2016

2.9.6.2 Siembra de las muestras de agua termal en el agar eosina azul de metileno y el agar manitol salado, recuento de las colonias crecidas y de las colonias que fermentaron la lactosa y el manitol respectivamente.

El procedimiento se realizó de la siguiente manera:

- Se rotularon dos cajas Petri de agar eosina azul de metileno y dos cajas Petri de agar manitol salado con el código del microorganismo, la cantidad (20uL o 100uL) y la fecha.
- En una placa Petri de vidrio se colocó un poco de alcohol industrial.
- Se tomó el asa de vidrio y se la empapó con el alcohol industrial para luego someterle a la llama de manera que esta se esterilice.

- Con una pipeta automática de 20uL y 100uL se colocó la muestra de agua termal en cada caja Petri respectivamente.
- La siembra se realizó con el asa de vidrio por extensión en la superficie del agar.
- Las cajas Petri se incubaron a 35°C durante 24 horas o más dependiendo de si aparece o no crecimiento.
- Se observaron las características de las colonias en cada uno de los agares y se interpretó los resultados. (Casado, 2012, p.23) (Laboratorios Britania S.A., 2015c) (Becton Dickinson, 2013a) (Laboratorios Britania S.A., 2010a) (Becton Dickinson, 2013b)

2.9.6.3 Estabilización del aislado bacteriano

Aislamiento de los microorganismos

- Se seleccionaron algunas colonias de bacterias de cada placa 3M Petrifilm sembrada (bacterias aerobias, *Escherichia coli*/coliformes, Staph Express, mohos y levaduras) y de los agares eosina azul de metileno y manitol salado, que sean representativas y diferentes en sus características como tamaño, forma y color.
- Se levantó el film superior de la placa Petrifilm y con ayuda de un palillo de madera estéril se toma del gel la colonia seleccionada.
- En el centro de cada cuadrícula del medio de cultivo Mueller Hinton se inoculó una colonia diferente haciendo un solo toque al agar.
- Se incubó durante 18 a 24 horas a 35°C para que las colonias crezcan y se pueda realizar un re-aislamiento.
- Luego de las 24 horas de incubación, se tomó una caja nueva de agar Mueller Hinton se dividió en cuadros y se identificó cada cuadrícula con un código.
- Con un palillo de madera estéril se tomó de la caja Petri anterior cada colonia y se la sembró en la caja Petri nueva (repique), luego se incubó en la estufa bacteriológica durante 18 a 24 horas a 35°C; el proceso se realizó al menos cuatro veces más para de esta manera conseguir la estabilidad del aislado bacteriano como se indica en la figura 7-2.

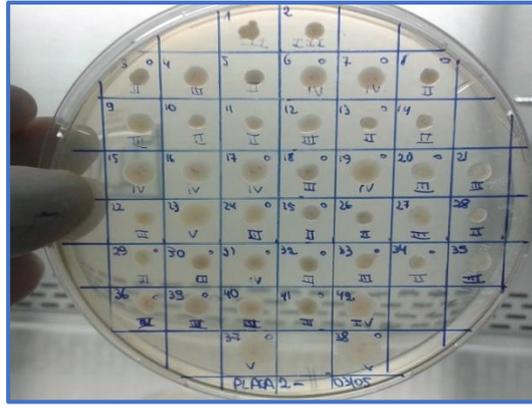


Figura 7-2: Primer repique de las colonias procedentes de las placas 3M Petrifilm.

Realizado por: CORTES Sandra, 2016

2.9.6.4 Siembra por agotamiento de estrías

Luego del último repique cuando ya se logró la estabilidad de crecimiento bacteriano, se seleccionaron varias colonias tomando en cuenta que sean las más representativas y diferentes para sembrarlas por agotamiento como se muestra en la figura 8-2 y así obtener clones aislados y puros.

- Se quemó el asa de platino, se enfrió y se tomó una colonia seleccionada del último repique realizado.
- Se abrió la caja Petri cerca del mechero y se realizó de 4 a 5 estrías a un lado de la caja, se quemó el asa de platino, se la enfrió, se giró la caja Petri y a partir de la última estría anterior se realizaron nuevas estrías.
- Se quemó y enfrió nuevamente el asa de platino, se giró la caja Petri y se repitió una vez más el proceso, se quemó y enfrió el asa de platino una vez más y a partir de la última estría se realizó una colita hacia el medio de la caja Petri.
- Una vez terminada la siembra por agotamiento se cerró la caja Petri y se incubó en la estufa bacteriológica de 18 a 24 horas a una temperatura de 35°C.
- Luego de que transcurrió el tiempo necesario se verificó que las colonias se aislaron y de estas se tomó una de cada una y se la volvió a repicar en una caja Petri con agar Mueller Hinton y a partir de esos clones bacterianos se realizaron las demás pruebas.

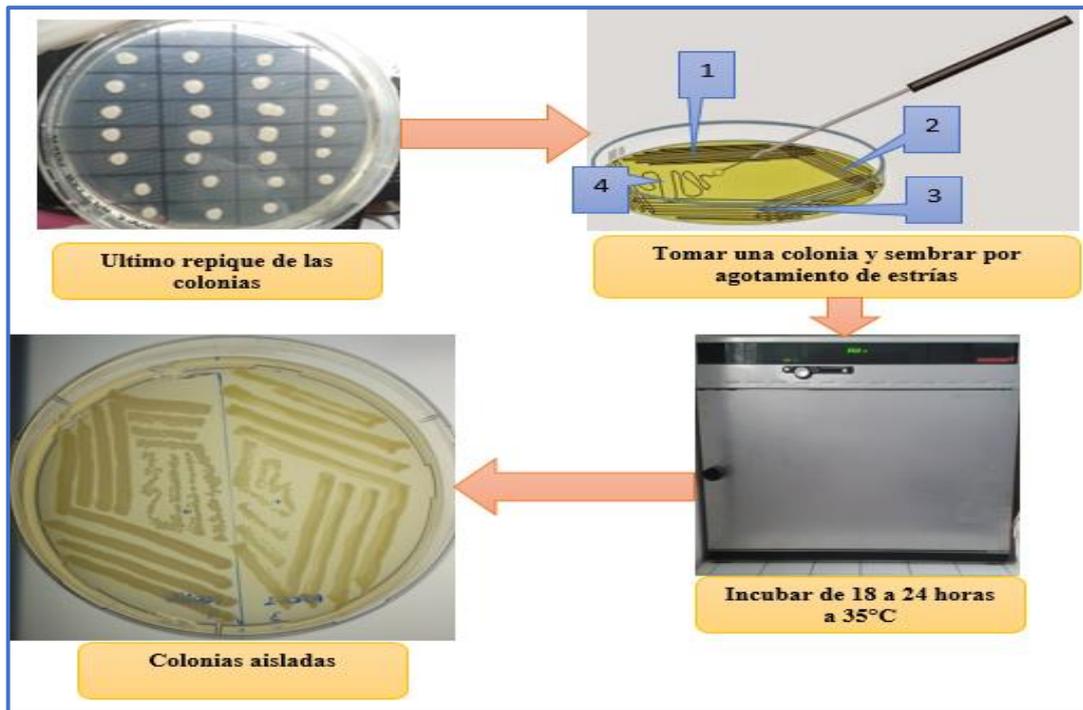


Figura 8-2: Siembra por agotamiento de estrías

Realizado por: CORTES Sandra, 2016

2.9.6.5 Descripción de la morfología macroscópica de las colonias bacterianas crecidas en el agar Mueller Hinton.

Se procedió a realizar la observación del tamaño, color, forma, borde, consistencia, elevación y superficie de cada una de las colonias, tomando en cuenta además lo que se indica en la figura 9-2.

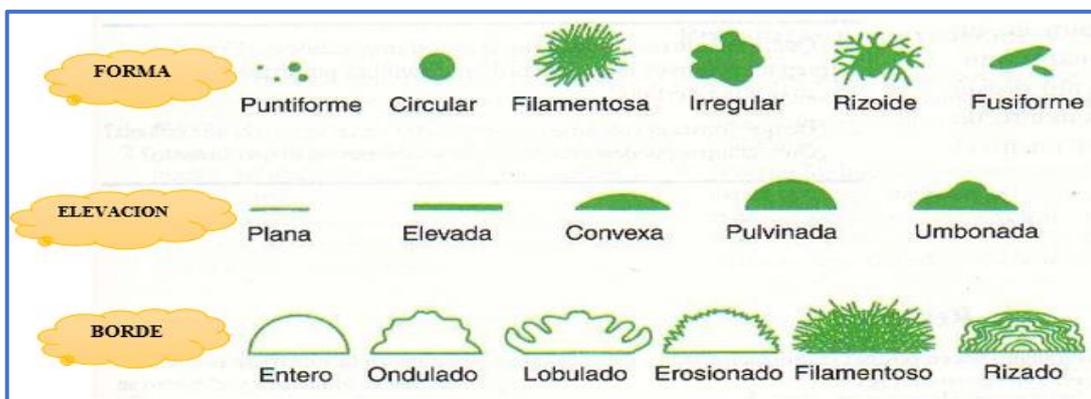


Figura 9-2: Descripción de la morfología macroscópica de las colonias

Fuente: ALIAN, 2012

2.9.6.6 Tinción GRAM del aislado bacteriano puro

A partir de los clones bacterianos anteriores se realizó la tinción Gram como se indica en la figura 10-2 para de esta manera comprobar si el clon estaba bien aislado, es decir determinar si solo se encontraban cocos o bacilos Gram (+) o Gram (-).

- En un portaobjetos se colocó una pequeña gota de suero fisiológico.
- Se quemó y enfrió el asa de platino con la cual se tomó un clon bacteriano aislado y se lo extendió en el suero fisiológico con movimientos suaves.
- Se fijó el extendido al portaobjetos con la ayuda de un mechero de alcohol.
- Se colocó sobre el extendido el reactivo cristal violeta, se lo dejó actuar durante 1 minuto y se lavó con agua el portaobjetos evitando que se arrastre el extendido.
- Se añadió sobre la extensión la solución de lugol y se lo dejó actuar por 1 minuto, luego se lavó el portaobjetos para retirar el exceso con agua.
- Se decoloró la muestra con una solución de alcohol etílico-cetona durante 30 segundos y se lavó inmediatamente el portaobjetos.
- Se cubrió la muestra con safranina, se dejó actuar por 1 minuto, se lavó el portaobjetos y dejó secar al aire libre. (Madigan, 2004)
- Por último se colocó una gota de aceite de inmersión sobre la muestra y se observó en el microscopio con lente de 100X.

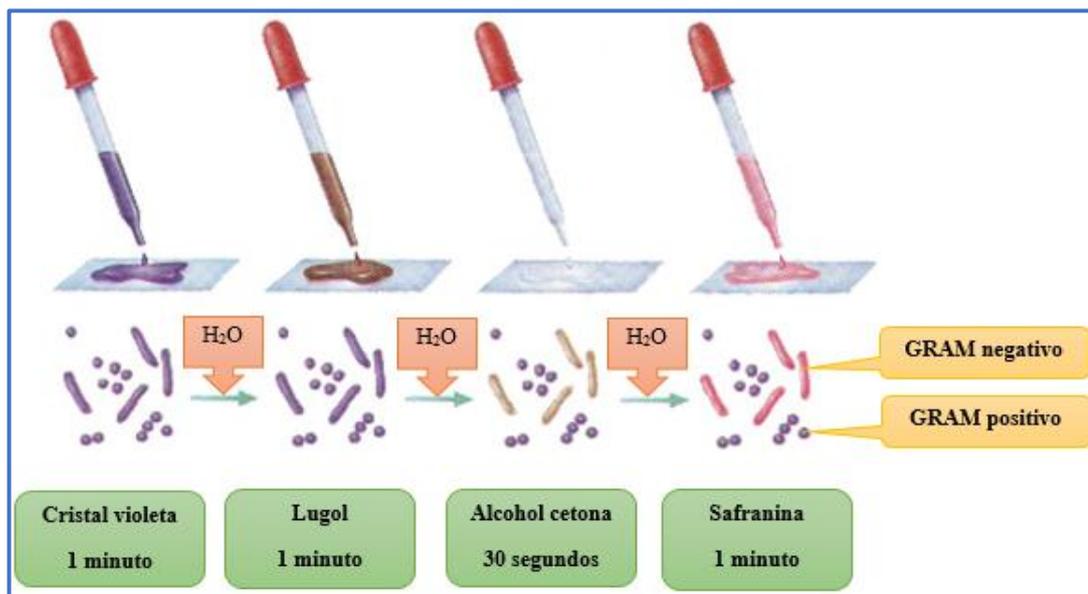


Figura 10-2: Tinción Gram

Fuente: GUATEMALA. BACTERIAS DE INTERÉS CLÍNICO, 2014

2.9.6.7 Pruebas bioquímicas para la identificación bacteriana

Los aislados bacterianos fueron sometidos a una serie de pruebas para su identificación.

Prueba de la catalasa

El procedimiento se realizó de la siguiente manera:

- En un portaobjetos con la ayuda de un palillo de madera se coloca una pequeña muestra del aislado bacteriano.
- Con un gotero de vidrio se agregó una gota de agua oxigenada 30%. (Winn, 2006, p.38) (Procedimientos Diagnósticos, 2008) (Universidad Técnica Federico Santa María, 2011) (Álvarez, 1995, p.115)

Resultados

Si se forma de manera inmediata burbujas la prueba es positiva, si no se forman burbujas es negativa como se muestra en la figura 11-2. (Procedimientos Diagnósticos, 2008) (Universidad Técnica Federico Santa María, 2011) (Álvarez, 1995, p.115)

Catalasa (+): *Staphylococcus aureus*, la familia *Micrococcaceae*.

Catalasa (-): *Streptococcus spp.* y *Enterococcus spp.* (Granados y Villaverde, 2003: p.99)

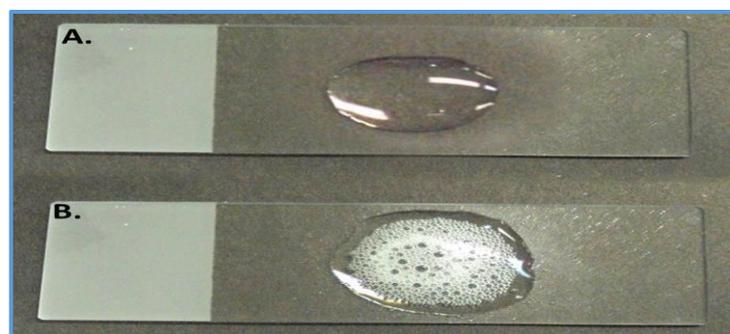


Figura 11-2: Resultados de la prueba de la catalasa

Fuente: HIGUITA L., 2016

Prueba de la oxidasa

El procedimiento se realizó de la siguiente manera:

- Se colocó un trozo de la tira de oxidasa en una placa Petri, sobre esta con ayuda de una pipeta Pasteur se añadió una gota de agua destilada estéril.
- Sobre la tira de oxidasa se colocó una muestra del clon bacteriano con ayuda de un palillo de madera estéril. (Winn, 2006, p.38) (Álvarez, 1995, p.135)

Resultados

Si la prueba es positiva luego de 30 segundos se apreciará un color fucsia o azul-violeta, si es negativa no generará color como se indica en la figura 12-2. (Universidad Técnica Federico Santa María, 2011) (Álvarez, 1995, p.135)

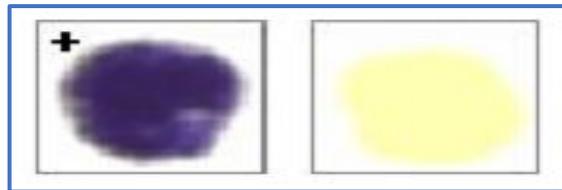


Figura 12-2: Oxidasa positiva (lado izquierdo) y oxidasa negativa (lado derecho)

Fuente: ARANGUREN, 2014

Prueba de la oxidación/fermentación

Para preparar el medio de cultivo se realizó lo siguiente:

- En una canastilla de papel filtro se pesó la cantidad necesaria del medio de cultivo.
- En un matraz Erlenmeyer se colocó una cantidad adecuada de agua destilada y el medio de cultivo que se pesó.

- Se realizó el cálculo respectivo de la glucosa tomando en cuenta que 1 gramo es por cada 100mL y se pesó.
- La glucosa fue añadida al matraz Erlenmeyer.
- Se disolvió todo el contenido del matraz tanto en frío como en calor hasta que se produzcan tres ebulliciones.
- En tubos de vidrio estériles de tapa roja se repartió aproximadamente 7mL del medio.
- Se autoclavó el medio de cultivo durante 30 minutos a 121°C, se dejó enfriar. (Universidad Técnica Federico Santa María, 2011)

El procedimiento de la prueba OF se realizó de la siguiente manera:

- Se prepararon dos tubos con el medio de cultivo Hugh y Leifson para cada colonia.
- Se identificaron los tubos con el código de cada colonia y uno como abierto y el otro como cerrado.
- Con la ayuda de la aguja de inoculación se tomó de la caja de agar Mueller Hinton un clon bacteriano y se lo inoculó en el centro de los dos tubos por punción sin llegar a tocar el fondo del tubo es decir hasta antes de 0.5cm del fondo.
- A un tubo se le colocó un tapón de parafina para lo cual se colocó un poco de parafina en un vaso de vidrio y se derritió al calor, luego la parafina se vertió sobre el tubo hasta formar un tapón de aproximadamente 1 a 2cm.
- Los dos tubos se incubaron a 35°C por 14 días, durante los cuales se fueron observando y anotando los cambios de color producidos. (Granados y Villaverde, 2003: p.23) (Procedimientos Diagnósticos, 2008) (Universidad Técnica Federico Santa María, 2011) (Álvarez, 1995, p.134)

Resultados

Si la bacteria oxida el hidrato de carbono únicamente cambia de color verde a amarillo el tubo sin parafina, en cambio el microorganismo es fermentador del hidrato de carbono si el viraje de color se produce en el tubo con y sin parafina tal como se muestra en la figura 13-2, si la bacteria no oxida ni fermenta el azúcar ambos tubos se mantienen de color verde y por tanto al microorganismo se le considera como inerte. Las bacterias anaerobias fermentan los carbohidratos, las facultativas pueden fermentar u oxidar y las aerobias estrictas sólo pueden oxidar. (Granados y Villaverde, 2003: p.23) (Procedimientos Diagnósticos, 2008) (Universidad Técnica Federico Santa María, 2011) (Álvarez, 1995, p.134)

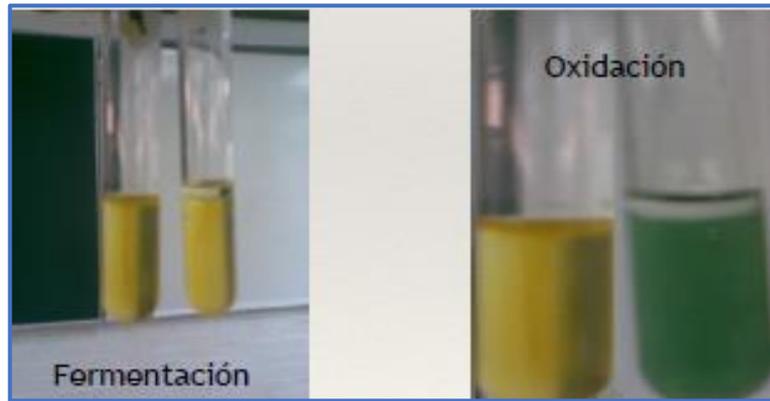


Figura 13-2: Resultados de la prueba de oxidación–fermentación

Fuente: PÉREZ, 2014

Siembra en agar sangre e identificación de hemólisis

Para determinar qué tipo de hemólisis genera un microorganismo realizamos lo siguiente:

- Se codificó la caja Petri con el código del microorganismo y la fecha.
- Se esterilizó el asa de platino y se tomó un clon bacteriano del agar Mueller Hinton el cual se sembró por agotamiento de estrías sobre la superficie del agar sangre.
- La caja Petri luego de ser inoculada se incubó durante 24 horas a 35°C.
- Se observó si alrededor de las colonias se formó o no una zona de hemólisis y cuáles eran sus características.
- Se anotó y reportó los resultados obtenidos de cada microorganismo. (Granados y Villaverde, 2003: p.26) (Álvarez, 1995, pp.124-125)

2.9.6.8 Identificación de cocos Gram positivos

Crecimiento y fermentación en agar Manitol Salado

El procedimiento se realizó de la siguiente manera:

- Dentro de la cámara de flujo laminar y con el mechero encendido se esterilizó el asa de platino y se tomó un clon bacteriano del agar Mueller Hinton.
- Se realizó la siembra en el agar Manitol Salado mediante estrías continuas.
Se incubó la caja Petri en una estufa bacteriológica de 18 a 24 horas a una temperatura de 35°C. (Laboratorios Britania S.A., 2015c) (Becton Dickinson, 2013b)

Para la interpretación de resultados se tomó en cuenta lo siguiente:

- *Staphylococcus aureus*: Crecimiento de las colonias y el medio se fermenta cambiando su color de rojo a amarillo.
- *Staphylococcus epidermidis*: Crecimiento de las colonias y el medio no fermentó. (Casado, 2012, p.23) (Laboratorios Britania S.A., 2015c) (Becton Dickinson, 2013b)

Prueba de la coagulasa

La prueba se realizó con plasma humano, permitió determinar la existencia de la enzima coagulasa de algunos *Staphylococcus* en cuyo caso será coagulasa positiva caso contrario será coagulasa negativa. (Granados y Villaverde, 2003: p.104) (Fernández, 2010, p.7) (Procedimientos Diagnósticos, 2008)

El procedimiento se realizó de la siguiente manera:

- Se extrajo sangre humana en tubos de tapa celeste y con movimientos suaves se homogenizó para evitar que la sangre se coagule.
- Los tubos de tapa celeste con la sangre reposaron unos minutos hasta que los glóbulos rojos sedimentaron, para una mejor separación del plasma se centrifugó a 3000 revoluciones durante 5 minutos.
- Con una pipeta automática se extrajo el plasma de los tubos de tapa celeste y se los pasó a otro tubo de vidrio estéril.
- Se identificaron varios tubos de vidrio estériles y con la pipeta automática se depositó 0,5mL de plasma en cada uno.
- Se tomó un clon bacteriano con el asa estéril, se introdujo dentro de cada tubo y se mezcló suavemente por rotación sin agitar.
- Se incubó los tubos semitapados en la estufa a 35°C durante 24 horas observando los tubos cada 30 minutos las primeras 4 horas para detectar si al inclinar un poco el tubo se había formado o no un coágulo. (Granados y Villaverde, 2003: p.105) (Procedimientos Diagnósticos, 2008) (Álvarez, 1995, pp.117-118)

Resultados

La prueba es positiva si en el transcurso de 3 a 4 horas el plasma se coagula de manera firme incluso al inclinar el tubo de vidrio tal como se muestra en la figura 14-2, sin embargo algunas bacterias con menos producción de coagulasa necesitan 24 horas de incubación. (Clavell, 2009) (Álvarez, 1995, p.118)

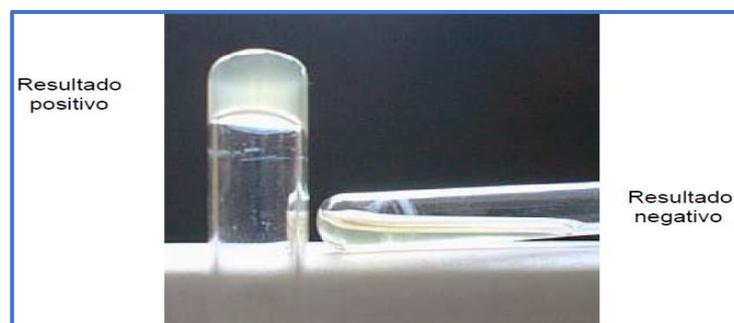


Figura 14-2: Resultados de la prueba de la coagulasa.

Fuente: CLAVELL, 2009

Crecimiento en caldo hipersalino al 6.5%

El procedimiento se realizó de la siguiente manera:

- Se preparó el medio de cultivo caldo tripticasa de soja al cual se le añadió cloruro de sodio hasta alcanzar la concentración de 6.5 gramos por cada 100mL.
- En cada tubo se depositó 3mL de caldo tripticasa de soja y esterilizó.
- Se los etiquetó con un respectivo código de los microorganismos.
- Con un asa estéril se tomó un clon bacteriano y se inoculó el caldo.
- Los tubos se incubaron de 24 a 48 horas a 35°C. (Álvarez, 1995, p.118)

Resultados

La prueba es positiva si se presenta turbidez en el medio lo cual indica crecimiento del microorganismo caso contrario la prueba es negativa como se muestra en la figura 15-2. (Álvarez, 1995, p.119)

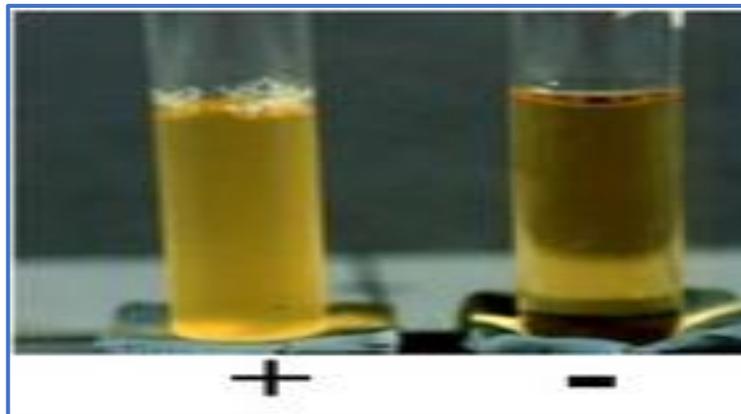


Figura 15-2: Resultados del crecimiento en caldo hipersalino

Fuente: ARANGUREN, 2014

Pruebas de diferenciación bacteriana por sensibilidad o resistencia a los antibióticos ácido nalidíxico 30ug, optoquina 5ug, bacitracina 0.04U y novobiocina 5ug.

El procedimiento se realizó como prosigue:

- En un tubo de vidrio estéril y rotulado se colocó 1.5mL de suero fisiológico.
- Con un hisopo estéril se tomó una colonia del agar Mueller Hinton y preparó una suspensión semejante a la densidad de la escala 0.5 de McFarland.
- Los tubos se mezclaron y fueron comparados con la escala de McFarland sobre una superficie iluminada y contra una línea negra.
- Con un nuevo hisopo se tomó un poco de la suspensión bacteriana eliminando el exceso del inóculo por rotación del hisopo en las paredes internas del tubo.
- Se inoculó en la caja Petri de agar Mueller Hinton realizando estrías sobre la superficie del medio de cultivo en tres direcciones y pasando dos veces el hisopo de forma circular por los bordes del agar.
- Se dejó reposar las cajas Petri inoculadas durante 10 minutos.
- Se tomó una pinza metálica y se la esterilizó acercándola a la llama del mechero.
- Utilizando la pinza metálica se colocó sobre la superficie del agar inoculado los discos de los antibióticos.
- Se presionó ligeramente los discos contra el medio de cultivo realizando tres pequeños toquécitos.
- La caja Petri reposó tapada durante 5 minutos.
- Se invirtieron las cajas y se incubaron a 35°C de 18 a 24 horas.
- Se observó y midió la presencia o ausencia de halos de inhibición de crecimiento microbiano.
- Se comparó las medidas de los diámetros de las zonas de inhibición con los estándares para ver si los microorganismos en estudio eran sensibles o resistentes y así poderlos identificar unos de otros. (Álvarez, 1995, pp.113-134)

Cabe mencionar que también se realizó la siembra de las colonias en medio Kligler y úrea con el procedimiento que se indica posteriormente en la identificación de bacilos Gram negativos.

2.9.6.9 *Identificación de bacilos Gram positivos*

Hidrólisis de la gelatina

Para preparar el agar se realizó lo siguiente:

- Se calculó y se pesó en papel aluminio el agar nutritivo en la cantidad suficiente para el volumen que se iba a preparar.
- Se realizó el cálculo del volumen de agua destilada y la cantidad de gelatina tomando en cuenta que 120 gramos es para un litro y se procedió a medir y pesar.
- En un matraz Erlenmeyer se colocó el agua destilada, agar nutritivo y la gelatina.
- Se disolvió tanto en frío como en calor, se autoclavó y se colocó en las placas Petri. (Clavell, 2009)

Para preparar 100mL del reactivo cloruro mercúrico ácido se siguió el siguiente procedimiento:

- En un balón aforado de 100ml se colocó una pequeña cantidad de agua destilada.
- En una canastilla de papel aluminio se pesaron 15 gramos de cloruro mercúrico.
- Se colocó el cloruro mercúrico en el balón aforado.
- Con una pipeta volumétrica se midió 20mL de ácido clorhídrico concentrado y por las paredes del balón aforado se vertió poco a poco.
- Se agito suavemente hasta la disolución del cloruro mercúrico.
- Se añadió al balón agua destilada hasta llegar a la línea de aforo. (Clavell, 2009)

Para realizar esta prueba se siguieron los siguientes pasos:

- Se tomó un clon bacteriano del agar Mueller Hinton con la ayuda de un asa estéril.
- Se inoculó el microorganismo en la placa de agar gelatina mediante estrías.
- La placa Petri se incubó a 35°C durante 2 días pues ya se obtuvo un buen crecimiento de la colonia.

- Sobre la colonia se colocó unas gotas de cloruro mercúrico ácido, se observó los resultados y se reportó. (Universidad Técnica Federico Santa María, 2011) (Clavell, 2009)

Resultados

Un microorganismo es gelatinasa positivo es decir capaz de hidrolizar la gelatina si alrededor del inóculo se presenta un halo incoloro, la prueba es negativa si alrededor del inóculo se forma un precipitado blanco producto de la reacción del reactivo con la gelatina como se muestra en la figura 16-2. (Universidad Técnica Federico Santa María, 2011) (Clavell, 2009)

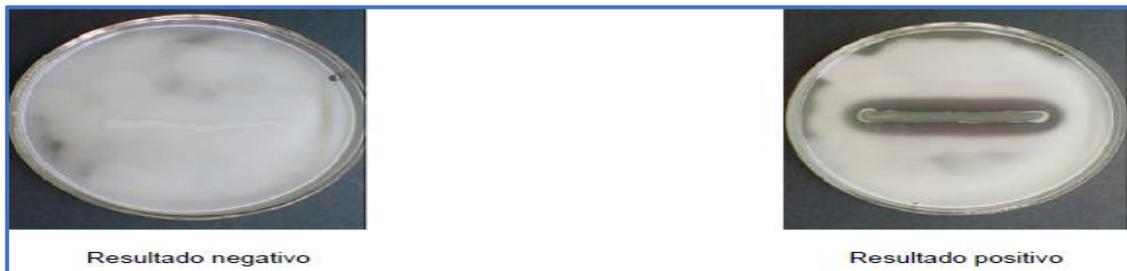


Figura 16-2: Resultados de la hidrólisis de la gelatina

Fuente: CLAVELL, 2009

Hidrólisis del Almidón

Para preparar el agar se realizó lo siguiente:

- Se realizó el cálculo y se pesó en papel aluminio el agar nutritivo en la cantidad suficiente para el volumen que se iba a preparar, este medio contiene extracto de carne y peptona.
- Igualmente se realizó el cálculo a pesar de la cantidad de maicena haciendo relación que 2 gramos es para un litro de agua destilada y se procedió a pesar.
- En un matraz Erlenmeyer se colocó el agua destilada, agar nutritivo y la maicena.
- Se disolvió tanto en frío como en calor, el medio de cultivo se autoclavó y se colocó en las placas Petri.

El procedimiento de esta prueba se realizó de la siguiente manera:

- Se esterilizó al mechero el asa de platino y se tomó un clon bacteriano del agar Mueller Hinton.
- La colonia fue inoculada en el agar almidón mediante una siembra en estrías.
- La placa Petri se incubó durante dos días a 35°C ya que se notó un buen desarrollo de la colonia.
- Se roció lugol sobre la colonia, se observó el resultado y se lo reportó. (Universidad Técnica Federico Santa María, 2011) (Álvarez, 1995, p.111)

Resultados

El microorganismo es amilasa positivo si alrededor del inóculo se presenta un halo incoloro, si aparece un color azul-pardo alrededor del inóculo el microorganismo es amilasa negativo pues al no poseer la enzima no pudo hidrolizar el almidón como se muestra en la figura 17-2. (Universidad Técnica Federico Santa María, 2011) (Álvarez, 1995, p.111)

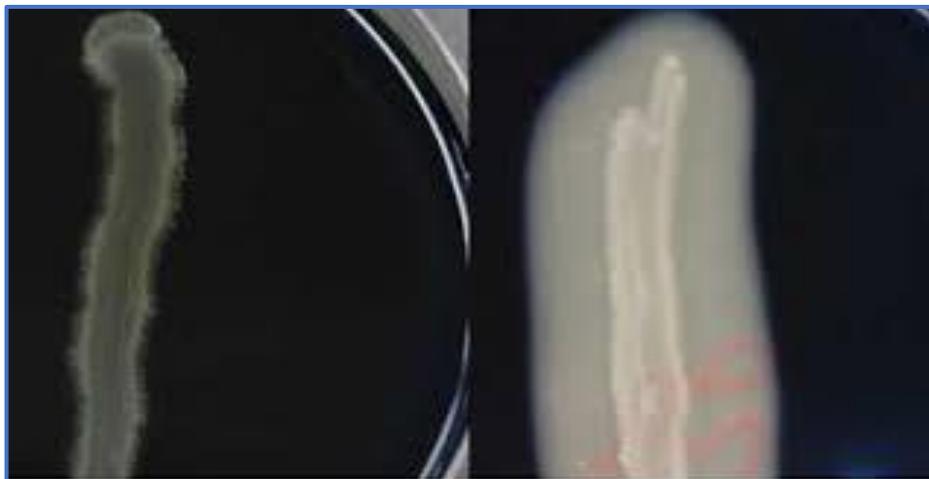


Figura 17-2: Prueba negativa (lado izquierdo) y prueba positiva (lado derecho).

Fuente: MARTIN, 2011

También se realizó la siembra en el agar manitol salado con el procedimiento indicado anteriormente, eosina azul de metileno y MacConkey, así como también las pruebas bioquímicas cuyos procedimientos se indican a continuación.

2.9.6.10 *Identificación de Bacilos Gram Negativos*

Crecimiento en agar Eosina Azul de Metileno

El procedimiento se realizó de la siguiente manera:

- En la cámara de flujo laminar y con el mechero encendido, se esterilizó el asa de platino y se tomó un clon bacteriano del agar Mueller Hinton.
- Se realizó la siembra en el agar eosina azul de metileno mediante estrías en la superficie del medio.
- Se incubó la caja Petri en una estufa bacteriológica de 18 a 24 horas a 35°C.
- Se observaron las características de las colonias y se reportó. (Laboratorios Britania S.A., 2010a) (Becton Dickinson, 2013a)

Crecimiento en agar MacConkey

El procedimiento se realizó de la siguiente manera:

- Con un asa de platino estéril se tomó un clon bacteriano del agar Mueller Hinton.
- La siembra se realizó por estrías continuas en la superficie del agar MacConkey.
- La caja Petri se incubó a 35°C de 24 a 48 horas.
- Se observó las características de las colonias y se reportó los resultados. (Granados y Villaverde, 2003: p.25) (Laboratorios Britania S.A., 2015b)

Crecimiento en agar *Salmonella-Shigella*

El procedimiento se realizó de la siguiente manera:

- Se esterilizó el asa de platino al mechero y se tomó un clon bacteriano del agar Mueller Hinton.
- Se realizó una siembra por estrías en la superficie del agar *Salmonella-Shigella*.
- La caja Petri se incubó a 35°C de 24 a 48 horas.
Se observó las características de las colonias y se realizó la interpretación respectiva. (Granados y Villaverde, 2003: p.27) (Laboratorios Britania S.A., 2015d)

Prueba del agar Kligler

El procedimiento se realizó de la siguiente manera:

- Con la aguja de inoculación estéril se tomó un clon bacteriano del agar Mueller Hinton.
- Se realizó una punción en el centro del tubo con agar Kligler hasta 0,6cm del fondo y se retiró la aguja por el mismo camino por el que entró.
- En la superficie del tubo se sembró por estriamiento en forma de S o de zig-zag. (Figura 18-2)
- Los tubos se incubaron semitapados a 35°C durante 18 a 24 horas. (Granados y Villaverde, 2003: p.24) (Álvarez, 1995, p.141)

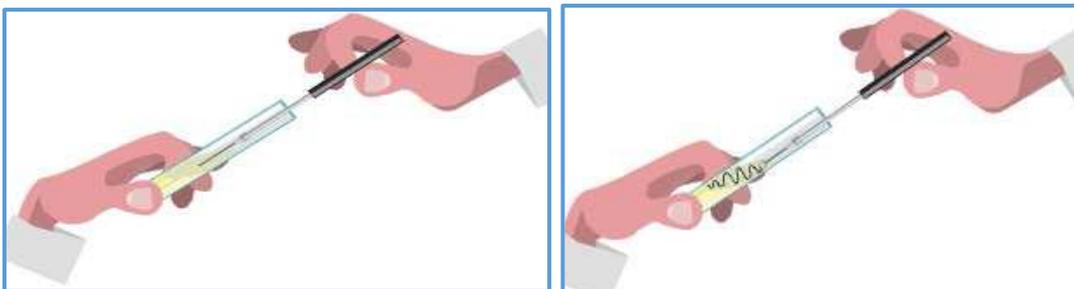


Figura 18-2: Siembra por punción y estría en el agar Kligler.

Fuente: SANTAMBROSIO, 2009

Resultados

El medio de cultivo es de color rosado o salmón, luego de que se ha sembrado el inóculo e incubado el tubo de vidrio puede generarse los resultados que se muestran en la tabla 1-2. (Álvarez, 1995, p.141)

Tabla 1-2: Resultados del crecimiento del microorganismo en agar hierro de Kligler.

Fermentación de glucosa	Vira a amarillo el fondo del tubo
Fermentación de lactosa	Vira a amarillo la superficie o pico de flauta del tubo
Fermentación de glucosa/lactosa	Vira a amarillo todo el tubo
Producción de ácido sulfhídrico	Precipitado negro de sulfuro ferroso
Gas en la fermentación de la glucosa	Burbujas o despegamiento del medio

Fuente: PROCEDIMIENTOS DIAGNÓSTICOS, 2008

Prueba del citrato

El procedimiento realizado fue el siguiente:

- Con una aguja de inoculación estéril se tomó un clon bacteriano.
- Se realizó la siembra en el tubo por un estriamiento en forma de S o de zig-zag únicamente en el pico de flauta del agar.
- Los tubos se incubaron semitapados a 35°C durante 24 a 48 horas. (Universidad Técnica Federico Santa María, 2011) (Álvarez, 1995, p.116)

Resultados

Si existe crecimiento y el medio toma un color azul la prueba del citrato es positiva, si no hubo crecimiento y el medio continua de color verde la prueba del citrato es negativa tal como se indica en la figura 19-2. (Universidad Técnica Federico Santa María, 2011) (Álvarez, 1995, p.116)



Figura 19-2: Prueba del citrato positiva (lado izquierdo) y prueba negativa (lado derecho)

Fuente: ARANGUREN, 2014

Prueba de la úrea

El procedimiento se realizó de la siguiente manera:

- Se tomó un clon bacteriano del agar Mueller Hinton con la aguja de inoculación estéril.
- Se sembró por estriamiento en forma de S o zig-zag en el pico de flauta.
- Los tubos se incubaron semitapados a 35°C durante 24 a 48 horas. (Laboratorios Britania S.A., 2010) (Universidad Técnica Federico Santa María, 2011) (Álvarez, 1995, p.142)

Resultados

Si la prueba es positiva se genera un cambio de color del medio a un rojo violeta y si el tubo continúa con la coloración inicial la prueba es negativa como se muestra en el gráfico 20-2. (Laboratorios Britania S.A., 2010b) (Universidad Técnica Federico Santa María, 2011) (Álvarez, 1995, p.142)



Figura 20-2: Ureasa negativa (1) y Ureasa positiva (2)

Fuente: UPEI, 2016

Medio SIM

El procedimiento se realizó de la siguiente manera:

- Con una aguja de inoculación estéril se tomó un clon bacteriano del agar Mueller Hinton.
- Se realizó una punción profunda en línea recta en el centro del tubo hasta antes de llegar al fondo y se extrajo la aguja por el mismo camino.
- Los tubos se incubaron semitapados a 35°C por 24 horas.
- Pasadas las 24 horas de incubación se añadió al tubo de 3 a 5 gotas del reactivo de Kovacs agitando suavemente.
- Se observó los resultados de movilidad, indol, ácido sulfhídrico y se los reportó. (Granados y Villaverde, 2003: p.133)

Resultados

Movilidad: Es positiva si hay turbidez o crecimiento más allá de la línea de siembra y es negativa si el crecimiento se mantiene en la línea de siembra, como se indica en la figura 21-2. (Gaitan, 2011)

Producción de H₂S: Positivo si se presenta un color negro a lo largo de la línea de siembra o en todo el medio caso contrario es negativo, como se muestra en la figura 22-2. (Gaitan, 2011)



Figura 21-2: Resultados de la motilidad en agar SIM.

Fuente: GAITAN, 2011

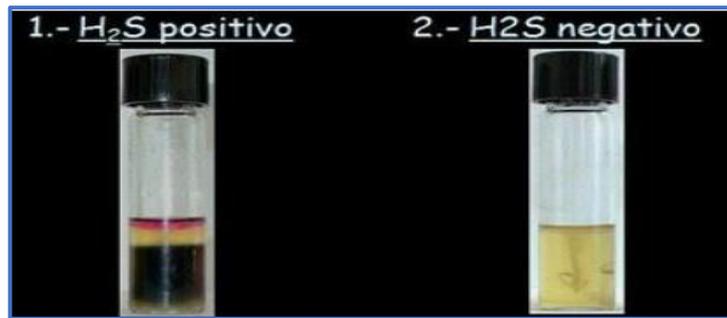


Figura 22-2: Resultados de la producción de H₂S en agar SIM.

Fuente: GAITAN, 2011

Indol: La reacción es positiva si se forma un anillo de color rojo en la superficie del tubo como en el caso de *Escherichia coli* y es negativa si no se presenta coloración como en el caso de la *Enterobacter aerogenes* (Figura 23-2), un anillo color naranja indica desarrollo de escatol que puede ser precursor del indol. (Universidad Técnica Federico Santa María, 2011) (Álvarez, 1995, p. 127)

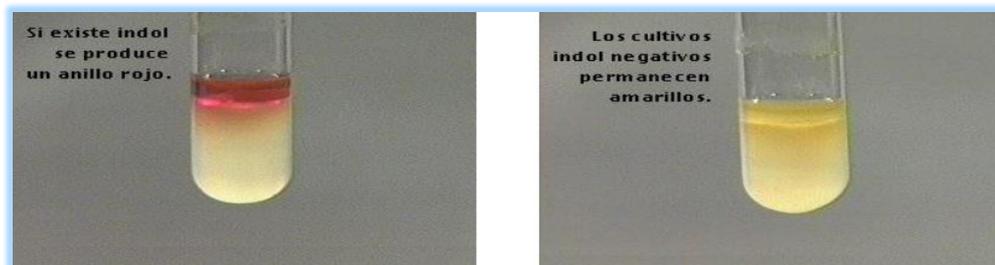


Figura 23-2: Resultados de la prueba del indol

Fuente: UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA, 2011

2.9.6.11 Antibiograma

Para esta determinación se utiliza el método de difusión en agar, se procedió a realizar lo siguiente:

- Se preparó el agar Mueller Hinton.

- En un tubo de vidrio estéril se colocó 1.5mL de suero fisiológico.
- Con el hisopo estéril se tomaron algunas colonias del microorganismo (3 a 4) y se colocaron en el tubo para realizar una suspensión bacteriana que en turbidez sea semejante al estándar McFarland de 0.5.
- Se tomó un poco de la suspensión bacteriana con el hisopo, eliminando el exceso del mismo en las paredes del tubo de vidrio.
- Se realizó una siembra por toda la superficie de la caja Petri rotándola 60°C cada vez en tres direcciones diferentes y dando dos vueltas alrededor de los bordes del agar.
- Con la ayuda de una pinza metálica flameada se coloca los discos de papel impregnados con una solución estandarizada del antibiótico, sobre la superficie del agar Mueller Hinton a una distancia considerable un disco en relación a otro.
- Se presionó cada disco dando tres toquécitos para asegurar su contacto con la superficie del agar.
- Se coloca el cultivo en la estufa microbiológica a 35°C y al siguiente día se mide el diámetro de la zona de inhibición (mm) con una regla pasando por el centro del disco para cada antimicrobiano y microorganismo.
- Los diámetros de inhibición que fueron medidos se compararon con las tablas del *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) para así ser reportado como susceptible, intermedio, moderadamente sensible o resistente. (Pedrique, 2002) (Procedimientos en Microbiología Clínica, 2000)

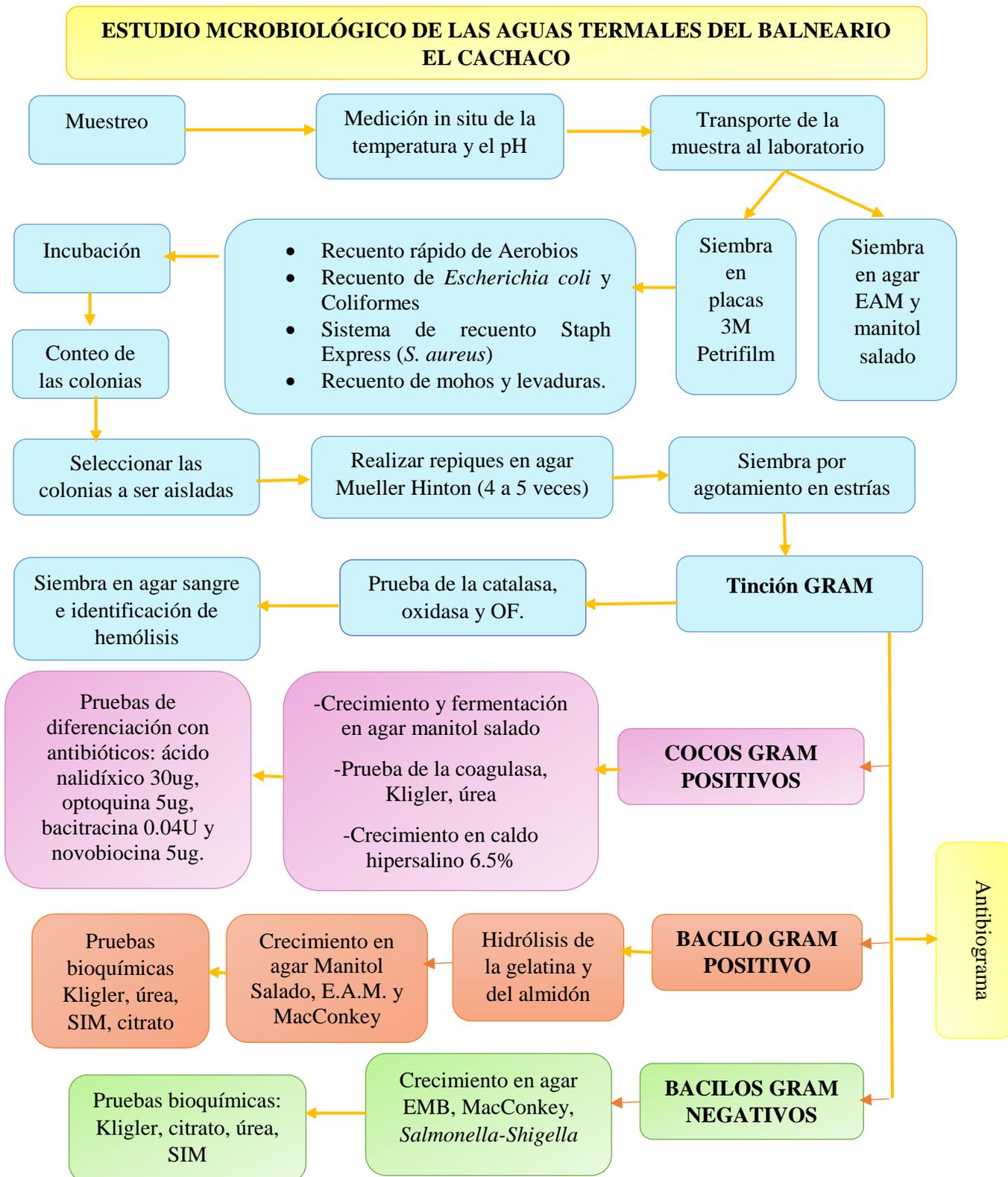


Figura 24-2. Esquema de la metodología general del estudio microbiológico realizado en las aguas termales del Balneario El Cachaco ubicado en la parroquia Calacalí de la provincia de Pichincha.

Realizado por: CORTES Sandra, 2016

Tabla 2-2: Procedimientos de identificación de los cocos Gram positivos del muestreo N°1.

MUESTREO 1								
ORIGEN	Código de la cepa	1-4	1-18	2-2	2-5	2-6	2-12	3-1
	Número de muestra	M1	M5	M1	M1	M3	M3	M1
	Placa 3M Petrifilm/Agar	E.M.B. 100uL	E.M.B. 100uL	Recuento Rápido de Aerobios	Recuento Rápido de Aerobios	Recuento Rápido de Aerobios	Recuento Rápido de Aerobios	Recuento Rápido de Aerobios
	Descripción macroscópica de la colonia crecida en la placa Petrifilm/Agar (tamaño, forma, color, bordes)	Mediana, circular, blanco cremoso con centro blanco grande, bordes lisos.	Mediana, circular, cremoso con centro morado oscuro pequeño, bordes lisos.	Mediana, circular, azul con un punto en el centro, bordes enteros	Muy pequeña, puntiforme, roja, bordes enteros	Grande, irregular, azul con centro muy azulado, bordes ondulados	Muy pequeña, puntiforme, roja, bordes enteros.	Grande, irregular, azul con puntos azules medianos color oscuro en el centro, bordes ondulados.
MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA	Morfología celular	Cocos/ Racimos	Cocos/ Racimos	Cocos/ Racimos	Cocos/ Racimos	Cocos/ Cadenas	Cocos/ Cadenas	Cocos/ Racimos
	Tinción Gram	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
	Catalasa	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
	Oxidasa	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
	OF	Oxidativo	Inerte	Fermentativo	Oxidativo	Fermentativo	Oxidativo	Inerte
	Agar sangre	Crecimiento	Blanco cremoso grisáceo,	Blanco algo transparente, >1mm,	Blanco cremoso, >1mm,	Blanco cremoso, >1mm,	Blanco cremoso, >1mm,	Cremoso transparente, <1mm.

PRUEBAS BIOQUÍMICAS		>1mm, circular, muy voluminosa	circular, muy voluminosa	circular, muy voluminosa	circular, bastante voluminosa	circular, muy voluminosa	circular, bastante voluminosa	circular, voluminosa	
	Hemólisis	γ	γ	γ	γ	α	γ	β	
	Agar Manitol Salado	No creció ni fermentó	No creció ni fermentó	No creció ni fermentó	No creció ni fermentó	No creció ni fermentó	No creció ni fermentó	No creció ni fermentó	
	Coagulasa	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	
	Crecimiento en NaCl 6.5%	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	
	Kligler	Glucosa	+	+	+	+	+	+	+
		Lactosa	-	-	-	-	-	-	-
		Gas	-	-	+	-	-	-	-
		H₂S	-	-	-	-	-	-	-
	Úrea	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	
DISCOS DE ANTIBIÓTICOS PARA DIFERENCIACIÓN BACTERIANA	Bacitracina 0.04U	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	
	Novobiocina 5ug	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Sensible	Resistente	
	Ácido nalidíxico 30ug	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Resistente	Sensible	Sensible	
	Optoquina 5ug	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	
IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO	Género y especie	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Streptococcus viridans</i>	<i>Streptococcus viridans</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	

Realizado por: CORTES Sandra, 2016

Tabla 3-2: Procedimientos de identificación de los cocos Gram positivos del muestreo N°1.

MUESTREO 1								
ORIGEN	Código de la cepa	3-7	3-11	3-17	3-62	4-2	4-7	4-11
	Número de muestra	M1	M1	M1	M1	M3	M5	M2
	Placa 3M Petrifilm/Agar	Recuento Rápido de Aerobios	Recuento Rápido de Aerobios	Recuento Rápido de Aerobios	Recuento de <i>E. coli</i> y Coliformes	Manitol salado 100uL	Manitol salado 100uL	Manitol salado 100uL
	Descripción macroscópica de la colonia crecida en la placa Petrifilm/Agar (tamaño, forma, color, bordes)	Mediana, irregular, roja oscuro con un punto en el centro y reflejo rosado, bordes ondulados	Mediana, irregular, roja con punto central rosado oscuro pequeño, bordes ondulados.	Pequeña, irregular, roja clara con un centro rosado oscuro, bordes ondulados.	Muy pequeña, puntiforme, roja claro, bordes enteros	Mediana, circular, cremosa, bordes lisos.	Pequeña, circular, cremosa, bordes lisos.	Mediana, circular, cremosa, bordes lisos.
MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA	Morfología celular	Cocos/Racimos	Cocos/Racimos	Cocos/Cadenas	Cocos/Cadenas	Cocos/Racimos	Cocos/Racimos	Cocos/Racimos
	Tinción Gram	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
	Catalasa	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
	Oxidasa	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
	OF	Inerte	Oxidativo	Inerte	Inerte	Inerte	Inerte	Inerte
	Agar sangre	Crecimiento	Blanco transparentoso,	Blanco cremoso,	Cremoso transparentoso,	Cremoso transparentoso,	Cremoso amarillento,	Cremoso amarillo claro,

PRUEBAS BIOQUÍMICAS			>1mm, circular, voluminoso	>1mm, circular, muy voluminoso	1mm, circular, muy voluminoso	<1mm, circular, muy voluminoso	1mm, circular, bastante voluminoso.	<1mm, circular, sin volumen	1mm, circular, voluminoso	
		Hemólisis	β	γ	γ	γ	γ	γ	γ	
		Agar Manitol Salado	No creció ni fermentó	No creció ni fermentó	No creció ni fermentó	No creció ni fermentó	Colonias rojas	Colonias rojas	No creció ni fermentó	
		Coagulasa	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	
		Crecimiento en NaCl 6.5%	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	
		Kligler	Glucosa	+	+	+	+	+	+	+
			Lactosa	-	-	-	-	-	-	-
			Gas	-	-	-	-	-	-	-
			H₂S	-	-	-	-	-	-	-
		Úrea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	
DISCOS DE ANTIBIÓTICOS PARA DIFERENCIACIÓN BACTERIANA	Bacitracina 0.04U	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Sensible	Resistente	Sensible		
	Novobiocina 5ug	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible		
	Ácido nalidíxico 30ug	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Resistente	Resistente	Resistente		
	Optoquina 5ug	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente		
IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO	Género y especie	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Streptococcus viridans</i>	<i>Streptococcus viridans</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Micrococcus luteus</i>		

Realizado por: CORTES Sandra, 2016

Tabla 4-2: Procedimientos de identificación de los cocos Gram positivos del muestreo N°2.

MUESTREO 2								
ORIGEN	Código de la cepa		I-25	I-29	I-39	I-42	I-46	I-60
	Número de muestra		M2	M1	M2	M4	M2	M5
	Placa 3M Petrifilm/Agar		Recuento Rápido de Aerobios	Recuento Rápido de Aerobios	Recuento Rápido de Aerobios	Recuento Rápido de Aerobios	E.M.B. 100uL	Staph Express
	Descripción macroscópica de la colonia crecida en la placa Petrifilm/Agar (tamaño, forma, color, bordes)		Pequeña, puntiforme, azul oscuro con reflejo azul claro mediano, bordes enteros	Mediano, alargado, rojo claro, bordes enteros	Mediana, circular, azul con centro azul oscuro y reflejo apenas celeste, bordes lisos	Mediana, puntiforme, negro con reflejo apenas gris, bordes enteros.	Enorme, circular, morada oscura con filo cremoso, bordes lisos.	Grande, puntiforme, negro, bordes ondulados
MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA	Morfología celular		Cocos/Racimos	Cocos/Cadenas	Cocos/Cadenas	Cocos/Racimos	Cocos/Cadenas	Cocos/Racimos
	Tinción Gram		Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
	Catalasa		Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
	Oxidasa		Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
	OF		Fermentativo	Inerte	Inerte	Fermentativo	Fermentativo	Fermentativo
	Agar sangre	Crecimiento	Creimoso transparentoso,	Creimoso grisáceo	Creimoso transparentoso	Blanco cremoso,	Creimoso transparentoso,	Blanco cremoso, 1mm,

PRUEBAS BIOQUÍMICAS			1mm, circular, voluminosa	transparentoso, <1mm, circular, bastante voluminoso	apenas amarillento, <1mm, circular, voluminoso	>1mm, circular, voluminoso	1mm, circular, muy voluminoso	circular, voluminoso.
		Hemólisis	γ	β	β	γ	γ	β
		Agar Manitol Salado	No creció ni fermentó	No creció ni fermentó	Colonias rojas	Colonias amarillas, fermentó amarillo	Colonias rojas	Colonias rojas
		Coagulasa	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		Crecimiento en NaCl 6.5%	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		Kligler	Glucosa	+	+	+	+	+
			Lactosa	+	-	+	+	-
			Gas	-	-	-	-	-
	H₂S		-	-	-	-	-	
	Úrea	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	
DISCOS DE ANTIBIÓTICOS PARA DIFERENCIACIÓN BACTERIANA	Bacitracina 0.04U	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	
	Novobiocina 5ug	Sensible	Resistente	Sensible	Resistente	Resistente	Sensible	
	Ácido nalidíxico 30ug	Resistente	Sensible	Resistente	Resistente	Sensible	Sensible	
	Optoquina 5ug	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	
IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO	Género y especie	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<i>Streptococcus viridans</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	

Realizado por: CORTES Sandra, 2016

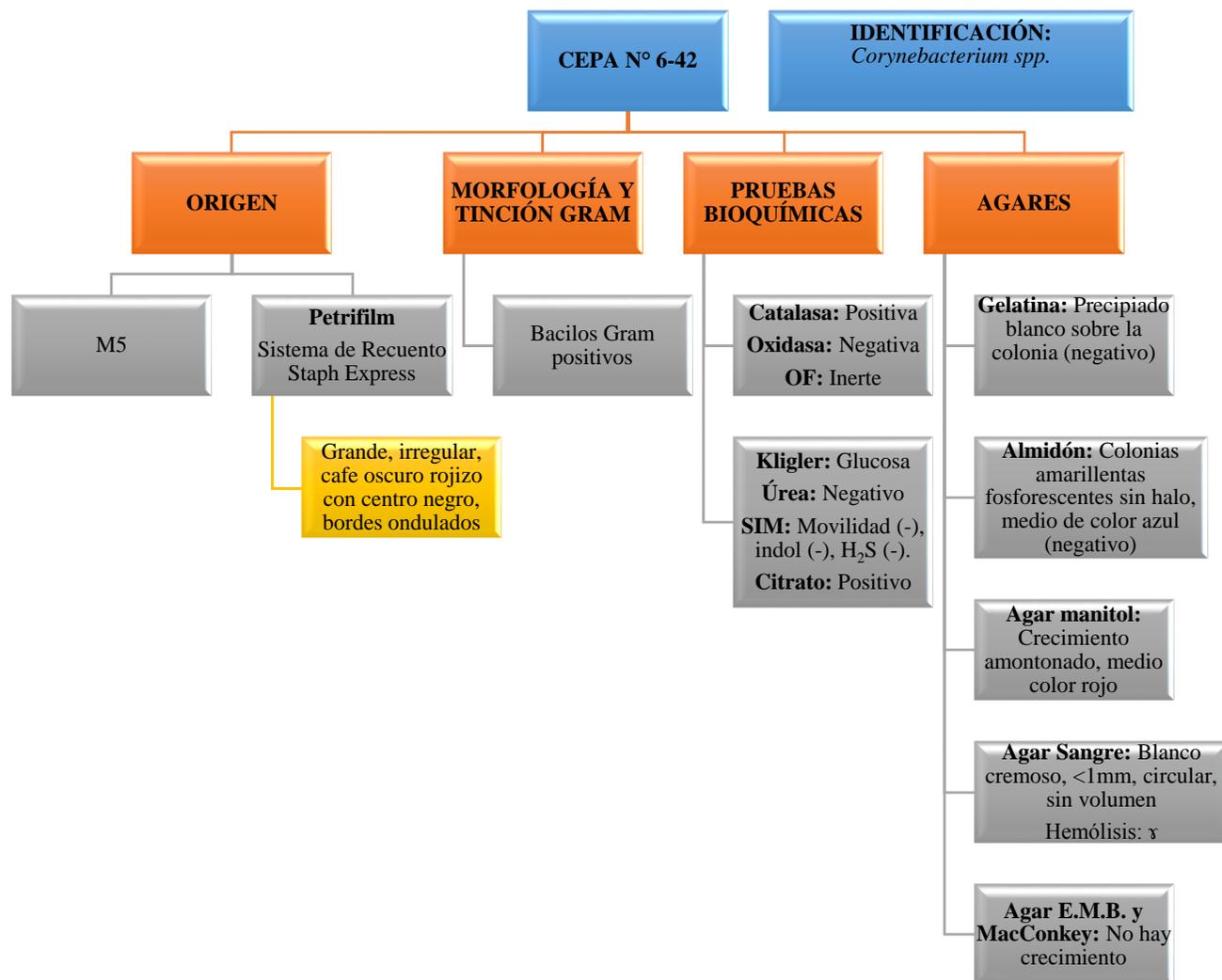


Figura 25-2: Esquema de identificación del Bacilo Gram positivo.

Realizado por: CORTES Sandra, 2016

Tabla 5-2: Procedimientos de identificación de los bacilos Gram negativos del muestreo N° 1.

MUESTREO 1						
ORIGEN	Código de la cepa		1-7	2-11	3-38	3-49
	Número de muestra		M1	M3	M5	M5
	Placa 3M Petrifilm/Agar		E.M.B. 100uL	Recuento Rápido de Aerobios	Recuento Rápido de Aerobios	Recuento Rápido de Aerobios
	Descripción macroscópica de la colonia crecida en la placa Petrifilm/Agar (tamaño, forma, color, bordes)		Mediana, circular, cremosa con centro blanco mediano, bordes lisos.	Mediana, irregular, roja, bordes ondulados.	Pequeña, puntiforme, azul oscuro con reflejo rosado claro, bordes enteros	Muy pequeño, puntiforme, roja con sombra celeste grande, bordes enteros
MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA	Morfología celular		Bacilos	Bacilos	Bacilos	Bacilos
	Tinción Gram		Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
PRUEBAS BIOQUÍMICAS	Catalasa		Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
	Oxidasa		Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
	OF		Inerte	Oxidativo	Oxidativo	Oxidativo
	Agar sangre	Crecimiento	Creimoso opaco, >1mm, circular, voluminosa	Creimoso opaco, >1mm, circular, voluminosa	Creimoso opaco, >1mm, circular, voluminosa	Creimoso opaco, >1mm de diámetro, circular, voluminosa

		Hemólisis	α	β	β	β
Agar MacConkey			Mediano, circular, incoloro, sin volumen	Crecimiento amontonado incoloro	Mediano, circular, incoloro	Mediano, circular, incoloro
Agar <i>Salmonella-Shigella</i>			Muy pequeño, circular, incoloro	Pequeño, circular, incoloro	Crecimiento amontonado, incoloro	Crecimiento amontonado, incoloro
Agar Eosina Azul de Metileno			Pequeño, circular, incoloro	Crecimiento amontonado, incoloro	Pequeño, circular, incoloro	Crecimiento amontonado, incoloro
Kligler	Glucosa		+	+	+	+
	Lactosa		-	-	-	-
	Gas		-	-	-	-
	H ₂ S		-	-	-	-
Citrato			Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
SIM	Movilidad		-	-	-	-
	Indol		+	-	-	-
	H ₂ S		-	-	-	-
Úrea			Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO	Género y especie		<i>Campylobacter spp.</i>	<i>Pseudomonas spp.</i>	<i>Pseudomonas spp.</i>	<i>Pseudomonas spp.</i>

Realizado por: CORTES Sandra, 2016

CAPÍTULO III

3. MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los parámetros físico-químicos temperatura y pH del agua termal del balneario El Cachaco como ya se explicó en la metodología fueron medidos con un termómetro de 360°C y con tiras reactivas de pH; del recuento de las colonias crecidas en las diferentes placas 3M Petrifilm, agar eosina azul de metileno y agar manitol salado se sacó un promedio o media aritmética, varianza y desviación estándar, el resto de resultados microbiológicos se muestran en tablas.

3.1 Parámetros Físico-químicos medidos in situ del agua termal del Balneario El Cachaco.

Tabla 1-3: Parámetros Físico-químicos del primer muestreo del agua termal del Balneario El Cachaco.

PARÁMETRO	SITIO MUESTREADO					PROMEDIO
	M1	M2	M3	M4	M5	
Color	Ligeramente amarillo	Ligeramente amarillo	Amarillo lechoso	Ligeramente amarillo	Amarillo lechoso	
Temperatura del agua (°C)	24	28	25	28	23	25,6
pH	7	6,5	7	6,5	7	6,8
Temperatura ambiente (°C)	16,5					
Altura (m)	2470					

Realizado por: CORTES Sandra, 2016

Tabla 2-3: Parámetros Físico-químicos del segundo muestreo del agua termal del Balneario El Cachaco.

PARÁMETRO	SITIO MUESTREADO					PROMEDIO
	M1	M2	M3	M4	M5	
Color	Ligeramente amarillo	Ligeramente amarillo	Amarillo lechoso	Ligeramente amarillo	Amarillo lechoso	
Temperatura del agua (°C)	24	28	25	26	24	25,4
pH	7	6,5	7	6,5	7	6,8
Temperatura ambiente (°C)	18					
Altura (m)	2470					

Realizado por: CORTES Sandra, 2016

Las aguas subterráneas naturales tienen propiedades fisicoquímicas según su composición química y las acciones externas de la naturaleza, estas propiedades pueden variar en el tiempo y el espacio. (Porras, 1985, p.24)

Las tablas 1-3 y 2-3 muestran los resultados obtenidos del análisis físico-químico del agua termal, en primer lugar relacionando la temperatura promedio del agua que en el primer muestreo fue de 25,6°C y en el segundo de 25,4°C con la temperatura ambiente de cada muestreo, se cumple lo indicado por Burbano (2015, p. 111) de que el agua será considerada termal cuando tenga una temperatura superior en al menos 5°C a la temperatura media anual del lugar en el que se encuentra.

Cabe mencionar que la temperatura ambiente varió en cada muestreo siendo en el primer caso de 16,5°C pues el muestreo se realizó en las primeras horas de la mañana y en el segundo caso el muestreo se realizó en la tarde cuando la temperatura ambiente era de 18°C en presencia de sol.

La temperatura promedio del agua termal del Balneario El Cachaco en los dos muestreos fue parecido, pero no coincide con el valor de 26,9°C reportado por el INAMHI en el año 2012, esto debido a que la temperatura en un sitio y momento dado depende de los aportes y pérdidas de calor que existan en ese punto, además cabe mencionar que la temperatura tiene relación con el tipo de terreno, la naturaleza de las rocas, profundidad de la que emerge el agua es decir del gradiente geotérmico (3°C por cada 100 metros) y de los fenómenos magmáticos del subsuelo. (Burbano, 2015, p.115) (Porras, 1985, p.24) (Barrionuevo, 2004, p.16)

De acuerdo a su temperatura promedio las aguas termales del balneario El Cachaco se clasificarían como hipotermales es decir que se encuentran en un rango de entre 20 y 30°C, coincidiendo con la investigación del INAMHI realizada en el 2012 en las aguas termales de Calacalí 1. (Burbano, 2015, p.111)

Estudios similares acerca de las propiedades físico-químicas del agua termal se han realizado en otros Balnearios como en el de la villa de Olmedo en donde Torija et al. (2015, p.38) mencionan que la temperatura del agua fue de 21,7°C considerada también hipotermal y el pH 8,2, así mismo en el estudio realizado en Baños de Jaraba Aragón Torija y colaboradores (2004, pp.502-503) determinaron que la temperatura del agua se encontraba entre 27 a 29°C considerada hipotermal y el pH en torno a 7,5.

En los sitios de muestreo M2 y M4 existió una mayor temperatura pues ahí era donde el agua emergía desde las profundidades del suelo, seguido del punto de muestreo M3 en donde la temperatura era de 25°C, este sitio a pesar de que estaba cercano a uno de los puntos de emergencia del agua refleja influencia de la temperatura ambiente del lugar, del trayecto del agua por el conducto hasta llegar a la piscina y del clima.

Por otro lado en los sitios de muestreo M1 y M5 la temperatura era menor, pues como mencioné anteriormente en estos sitios el agua termal estaba influenciada por el clima y las variaciones diarias o estacionales de la temperatura ambiente, además el sitio de muestreo M5 se encontraba alejado del punto de surgencia del agua termal.

En cuanto al color del agua termal en los sitios de muestreo M1, M2 y M4 era ligeramente amarilla debido al reflejo del fondo por donde corre el agua, no así en las muestras tomadas de la piscina (M3 y M5) en donde el color del agua era amarillo lechoso lo cual se debe a que generalmente las aguas subterráneas contienen sales solubles como hierro, manganeso y otras sustancias coloreadas suspendidas o disueltas en ella que además generaban turbidez. (Barrenechea, 2005)

Cabe mencionar también que en la formación del color del agua además de la composición mineral influye el pH, temperatura, descomposición de la materia, materia orgánica del suelo y la solubilidad de los compuestos coloreados. (Barrenechea, 2005)

La turbidez de estas aguas termales provendría entonces de las partículas en suspensión de los minerales originarios de la erosión del suelo y las rocas, del aporte de las aguas de lluvia y de los microorganismos que habitan en las mismas; esta turbidez afectaría la calidad estética del agua es así que la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) y la OMS establecen que el agua para consumo humano debería tener hasta 5 unidades nefelométricas de turbiedad (UNT). (Marín, 2008) (Barrenechea, 2004) (Barrenechea, 2005)

Un aspecto importante que cabe mencionar es que se observó presencia de gas en los sitios de muestreo M2 y M4 que de acuerdo al Instituto Geológico y Minero de España (2002), podría ser reportado como anhídrido carbónico disuelto el cual generalmente proviene de la disolución ácida de carbonatos, una parte del anhídrido carbónico se encontraría en forma de gas y otra que debe estar reaccionando con el agua para dar ácido carbónico mismo que se disocia parcialmente en los iones carbonato y bicarbonato.

En cuanto al pH este interviene en múltiples procesos químicos y biológicos del agua, el pH fue medido in situ es decir en el momento de la toma de la muestra pues la temperatura lo afecta de manera directa pudiendo incrementarse hasta en un 8%. (Porras, 1985, p.25)

La evaluación de los valores de pH en la fuente termal mostró un promedio de 6,8 en ambos muestreos lo cual es un indicativo de que las aguas termales son neutras, este valor es un poco alto si lo comparamos con el valor del INAMHI que fue de 6,39 lo cual puede deberse a variaciones normales en la composición química del agua termal. (Burbano, 2015, p.115)

Finalmente se debe tomar en cuenta que el crecimiento microbiano está relacionado de manera directa a la temperatura, es decir que a una temperatura mínima se inhibe el crecimiento, a temperatura máxima se produce la muerte celular y que una temperatura óptima permite una tasa máxima de crecimiento, entonces podemos decir que en estas aguas termales pueden desarrollarse los microorganismos mesófilos cuya temperatura óptima de crecimiento está entre 25 y 40°C. (Caimanque, 2012)

En cuanto al pH este condiciona el crecimiento y la supervivencia de las bacterias pues cada microorganismo posee un rango de pH adecuado para vivir, en las aguas termales del balneario El Cachaco pueden crecer microorganismos neutrófilos. (Caimanque, 2012)

3.2 Recuento de microorganismos aerobios mesófilos presentes en las aguas termales del Balneario El Cachaco.

Luego de haber inoculado las placas 3M Petrifilm Recuento Rápido de Aerobios con cada una de las muestras de agua termal y posteriormente incubadas a 35°C se obtuvieron los resultados que se muestran en la tabla 3-3 y los promedios que se indican en el gráfico 1-3.

Tabla 3-3: Recuento de aerobios mesófilos de las aguas termales muestreadas del Balneario El Cachaco.

SITIO MUESTREADO	Primer muestreo (UFC/mL)	Segundo muestreo (UFC/mL)	Media	Desviación estándar	Varianza
M1	66	134	100	48.0832	2312
M2	2	192	97	134.3502	18050
M3	20	41	31	14.8492	220.5
M4	4	2	3	1.4142	2
M5	163	28	96	95.4594	9112.5
RESULTADOS TOTALES	255	397	65	45.3023	2052.3

Realizado por: CORTES Sandra, 2016

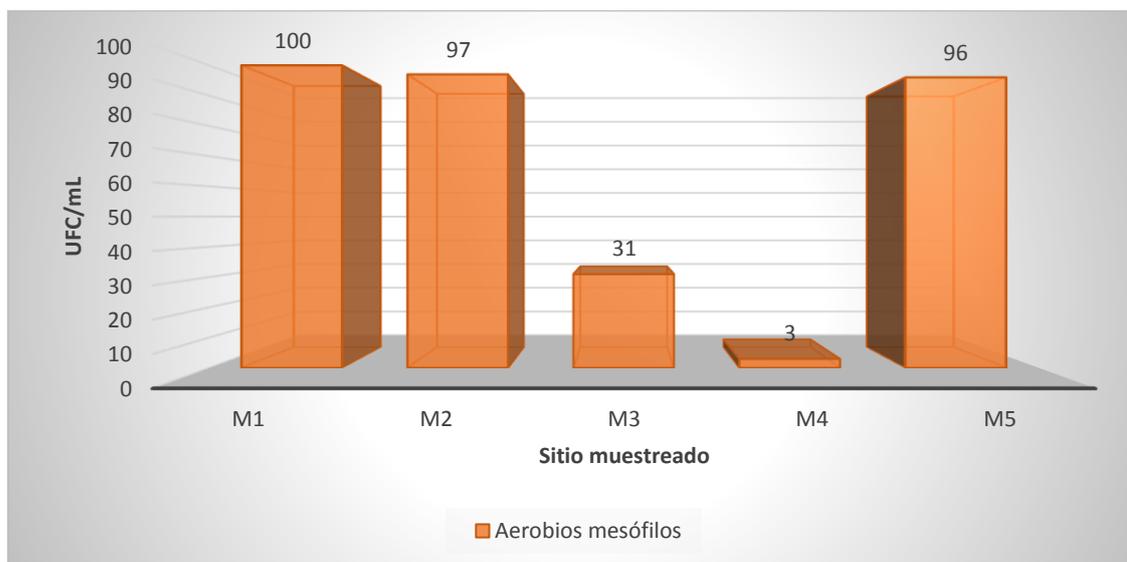


Gráfico 1-3: Promedios del recuento de aerobios mesófilos en los sitios muestreados del Balneario El Cachaco.

Realizado por: CORTES Sandra, 2016

El agua termal posee dos grupos de microorganismos el un grupo son las bacterias autóctonas dependientes de las propiedades fisicoquímicas del agua como la composición, temperatura, pH, nutrientes, oxigenación y el otro grupo lo conforman las bacterias alóctonas procedentes del suelo, vegetales, aguas residuales, heces fecales, etc.; el contenido bacteriano varía en relación al tipo

de agua, cantidad de sales inorgánicas, sustancias orgánicas, enturbiamiento y temperatura. (De La Rosa y Mosso, 2000, p.153-154)

En las piscinas la contaminación ocurre por la presencia de materia orgánica y mineral, tierra y principalmente por los microorganismos saprófitos que pueden o no ser patógenos, que el usuario deja al sumergirse en el agua, por lo cual se utilizan a los aerobios mesófilos como uno de los indicadores de la calidad del agua. (San Martín, 2002) (Análisis microbiológico de los alimentos, 2014, pp.5-6)

Como se observa en la tabla 3-3 en el primer muestreo realizado cuando no hubo presencia de turistas, la mayor cantidad de microorganismos aerobios mesófilos se encontraba en el sitio de muestreo M5 debido a que es por ahí por donde los usuarios días anteriores han ingresado a la piscina en donde han dejado los microorganismos que transportaban en su cuerpo y al estar el agua estática las bacterias se encontraban concentradas en ese lugar.

El sitio de muestreo M2 presentó menos cantidad de colonias aerobias mesófilas, esto debido a que el agua termal en ese momento no debió recibir la influencia de ningún tipo de agente contaminante externo ni hubo presencia de bañistas, no así en el segundo muestreo que se realizó cuando hubo presencia de usuarios siendo este mismo punto en el que hubo mayor presencia de aerobios mesófilos debido a que al haber bañistas el agua de la piscina regresa a este punto de surgencia acarreado las bacterias.

La menor cantidad de bacterias aerobias mesófilas en el segundo muestreo se encontraba en el punto M4, pues este en su mayor parte estaba protegido por una tapa de cemento que incluso pasó desapercibido por los usuarios del balneario.

Tomando en cuenta el promedio de los dos muestreos, el punto M1 contiene la mayor cantidad de bacterias aerobias mesófilas con 100UFC/mL, ya que este sitio estaba expuesto al ambiente, bañistas y a la vegetación selvática del lugar, no así en el punto de muestreo M4 en donde la cantidad promedio de bacterias fue de 3UFC/mL como se observa en el gráfico 1-3.

Cabe mencionar que la cantidad de aerobios mesófilos permite estimar la carga de microorganismos de una muestra y la calidad sanitaria del agua; un recuento bajo no indica que hay ausencia de bacterias patógenas. (Análisis microbiológico de los alimentos, 2014, pp.5-6)

Andueza menciona que la presencia de bacterias aerobias mesófilas en cantidades elevadas muestra la existencia de contaminación y problemas en la higiene del agua; además el Código Sanitario Mexicano indica que el recuento de aerobios mesófilos no debe sobrepasar de 200 colonias por cada mL de agua lo cual se cumplió al realizar el recuento en cada punto muestreado. (Andueza, 2014) (Técnicas para la enumeración de microorganismos, 2012)

De la Rosa et al. (2015, p.57) en un estudio de la microbiología del agua mineral del Balneario Villa de Olmedo citan un número de bacterias aerobias viables menor a 5 UFC/mL en el punto de emergencia; Mosso y De la Rosa (2011, p.61) en una investigación en los manantiales mineromedicinales del Balneario de Baños de la Concepción indican que en los tres manantiales en el sitio de emergencia el número de bacterias heterótrofas y oligotrofas aerobias viables fue menor de 20 UFC/mL lo cual indicó que la protección de los manantiales era adecuada.

Así mismo en una investigación realizada por De la Rosa et al. (2009, p.768) acerca de la microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario de Alicún de las Torres (Granada), los investigadores determinaron que en el punto de emergencia del agua el número de bacterias heterótrofas y oligotrofas aerobias viables fue menor a 100UFC/mL lo cual no representó un riesgo sanitario.

Mosso et al. (2006, pp.293-294) en un estudio de la microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario Cervantes mencionan que la cantidad de bacterias heterótrofas y oligotróficas aerobias viables en los sitios donde emergen los dos manantiales fue menor a 100UFC/mL, lo mismo mencionan Mosso et al. (2008, p. 511) en el estudio de los manantiales mineromedicinales del Balneario de Valdelateja además de una cantidad de bacterias esporuladas menor a 5UFC/mL, lo cual mostró una adecuada protección de los manantiales termales.

De igual manera en la investigación realizada por De la Rosa et al. (2007, pp. 257-258) acerca de la microbiología del manantial mineromedicinal del Balneario Puente Viesgo se muestra que en el punto de emergencia del agua el número de bacterias heterótrofas y oligotrofas aerobias viables y de bacterias esporuladas fue menor a 10UFC/mL lo que indicó que el hábitat acuático subterráneo estaba protegido de cualquier contaminación externa.

Además De la Rosa y colaboradores (2004, p.531) en un estudio de la microbiología de las aguas mineromedicinales de los Balnearios de Jaraba mostraron que el número de bacterias heterótrofas aerobias viables era menor a 10UFC/mL en todos los manantiales lo cual indicó que existía una buena protección de los mismos.

Todos los resultados de estos estudios microbiológicos coinciden con los promedios de aerobios mesófilos detectados en los diferentes sitios muestreados del Balneario El Cachaco en donde las bacterias aerobias mesófilas no superaron las 100UFC/mL, por tanto podemos decir que estos microorganismos no representan un riesgo sanitario mostrando así que el acuífero tiene una aceptable protección.

La presencia de bacterias aerobias mesófilas en todos los puntos muestreados nos indica que las mismas pueden haber provenido del ambiente y de los usuarios del agua termal, sin embargo se debería tomar alguna medida de higiene adicional que disminuya la cantidad de estos

microorganismos especialmente en los sitios de muestreo M1, M2 y M5 en donde se evidencia una cantidad elevada de microorganismos.

3.3 Recuento de *Escherichia coli* y Coliformes totales presentes en las aguas termales del Balneario El Cachaco.

El recuento de *Escherichia coli* y Coliformes totales se realizó luego de haber incubado a 35°C las placas 3M Petrifilm inoculadas con las muestras de agua termal, en donde se obtuvo los resultados que se muestran en la tabla 4-3.

Tabla 4-3: Recuento de *Escherichia coli* y Coliformes totales en los sitios muestreados del Balneario El Cachaco.

SITIO MUESTREADO	Número de muestreo	UFC/mL		TOTAL	Media	Desviación estándar	Varianza
		<i>Escherichia coli</i>	Coliformes totales				
M1	Primer muestreo	0	6	6	8	2.1213	5
	Segundo muestreo	0	9	9			
M2	Primer muestreo	0	0	0	0	0	0
	Segundo muestreo	0	0	0			
M3	Primer muestreo	0	1	1	3	2.8284	8
	Segundo muestreo	0	5	5			
M4	Primer muestreo	0	0	0	0	0	0
	Segundo muestreo	0	0	0			
M5	Primer muestreo	0	7	7	5	3.5355	13
	Segundo muestreo	0	2	2			
RESULTADOS TOTALES		0	30	30	3	3.4205	12

Realizado por: CORTES Sandra, 2016

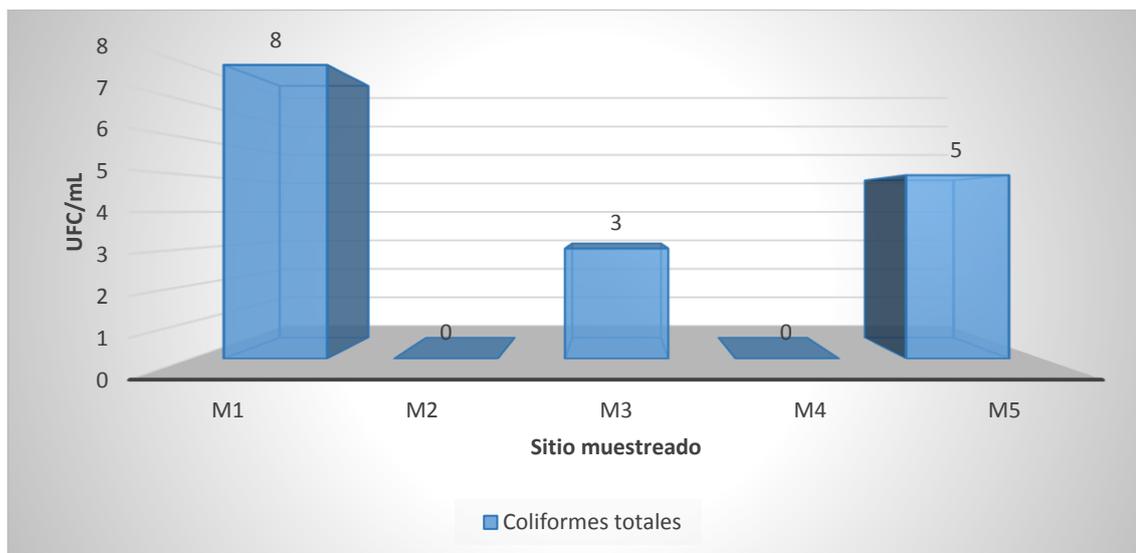


Gráfico 2-3: Promedios del recuento de Coliformes totales de los sitios muestreados del Balneario El Cachaco.

Realizado por: CORTES Sandra, 2016

Las aguas termales además de la microbiota autóctona pueden contener microorganismos alóctonos procedentes de otros hábitats como por ejemplo los indicadores fecales (*Escherichia coli*, enterococos, *Clostridium* sulfito-reductores y *Clostridium perfringens*), además de gérmenes patógenos como la *Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. (Rodés, 2001, p.80)

Según Arcos M. et al. (2005, p.72) la presencia de coliformes es uno de los aspectos que se considera para determinar la contaminación bacteriana reciente del agua, estos pueden pertenecer a dos grupos el uno son los coliformes totales de los géneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Citrobacter* y el otro grupo son los coliformes fecales (*Escherichia coli*, ciertas especies de *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Citrobacter*). (Vázquez, 2013)

En la tabla 4-3 se muestra el crecimiento de las colonias bacterianas en los diferentes sitios muestreados del balneario El Cachaco, en donde no ha existido presencia de *Escherichia coli* no así en el caso de los coliformes que aparecieron en tres de los cinco puntos muestreados.

Vázquez S. y colaboradores (2013) mencionan que las bacterias de origen intestinal como la *Escherichia coli*, constituye uno de los principales indicadores de contaminación fecal por heces de humanos o animales, este microorganismo patógeno entérico no sobrevive en el agua debido a la temperatura de esta, efectos de la luz solar, otras bacterias que habitan en la misma y a la composición química del agua razones por las cuales en este estudio no se detectó su presencia. (Pullés, 2014, p.27) (Guías para la calidad del agua potable, 2006) (Arcos, 2005, p.72)

En cuanto al recuento de coliformes totales en el primer muestreo, el mayor número de microorganismos se encontraban en punto muestreado M5 seguido del sitio M1 mientras que en el segundo muestreo el punto M1 mostró mayor cantidad de coliformes totales seguido del sitio M3; en cambio en los puntos muestreados M2 y M4 no se detectó crecimiento de coliformes.

Tomando en cuenta el promedio de coliformes totales en los dos muestreos los sitios en los que existe mayor número de estas bacterias son M1 con 8UFC/mL y M5 con 5UFC/mL como muestra el gráfico 2-3, ya que se encuentran expuestos al ambiente que los rodea, suelo, polvo, vegetación y a las heces de las personas y animales.

Cano F. (2016) indica que la norma técnica Guatemalteca COGUANOR NTG 29001 acerca del agua potable establece que no se debe detectar coliformes totales y *Escherichia coli* en 100mL de agua, menciona también que los coliformes se encuentran en las heces de los humanos y animales en una concentración de 1-10 millones por cada gramo de heces por lo que son rápidamente detectables.

Según la Norma Mexicana NOM-127-SSA1 de agua para uso y consumo humano el número permitido de coliformes totales es de menos de 2 UFC por cada 100mL de agua y de coliformes fecales es 0 UFC/mL, la norma técnica colombiana NTC 813 de agua y agua potable (2007) menciona que en 100mL de una muestra de agua no debe haber presencia de *Escherichia coli*. (Técnicas para la enumeración de microorganismos, 2012)

De igual manera De La Rosa M^a. et al. (2000, p. 156) mencionan que al ser las aguas mineromedicinales de uso terapéutico no deben tener bacterias patógenas ni indicadoras de contaminación fecal pues estas representarían un grave riesgo sanitario.

Por otro lado el Real Decreto 742/2013 de los criterios técnico sanitarios de la calidad del agua y del aire de las piscinas de España, indica que en las piscinas de uso recreativo no debe haber presencia de *Escherichia coli* (0 UFC en 100mL) y que en caso de sospecha de que existe este microorganismo o se constate incumplimiento del valor de referencia indicado, se cerrará el lugar y se tomaran acciones correctivas a fin de no poner en riesgo la salud de los bañistas.

Como se puede ver en el gráfico 2-3 la cantidad promedio de coliformes totales en los puntos muestreados M1, M3 y M5 del Balneario El Cachaco superaron lo establecido en las normas de agua potable mencionadas, pero en cambio se cumplió con la total ausencia de *Escherichia coli* inclusive en comparación lo dispuesto en el Real Decreto 742/2013 de España.

De La Rosa y colaboradores (2015, p.58) en un estudio microbiológico del agua mineral del Balneario de la Villa de Olmedo, mencionan que no han encontrado presencia de indicadores de contaminación fecal (coliformes fecales, enterococos, *Clostridium* sulfito-reductores,

Clostridium perfringens y *Escherichia coli*) ni microorganismos patógenos cumpliendo así la normativa del agua de consumo humano.

El mismo resultado se obtuvo en la investigación de la microbiología del manantial mineromedicinal del Balneario Puente Viesgo, en el estudio de la microbiología de las aguas mineromedicinales de los Balnearios de Jaraba, en la investigación realizada en tres manantiales del Balneario de Baños de la Concepción de Villatoya y en la investigación realizada sobre la microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario de Alicún de las Torres. (De La Rosa Jorge, 2007, pp.260-261) (De La Rosa Jorge, 2004, p.535) (Mosso Romeo, 2011, p.62) (De La Rosa Jorge, 2009, p.769)

En cambio Mosso et al. (2006, p.296) en su estudio microbiológico de las aguas de los dos manantiales mineromedicinales del Balneario Cervantes, señalan que en los puntos de emergencia de estas aguas hubo presencia de coliformes totales y esporas de *Clostridium* sulfito-reductores pero en una pequeña cantidad (menos de 10/100mL de agua) que provenían del suelo por tanto no fueron considerados indicadores de contaminación fecal.

Mosso et al. (2008, p.515) en una investigación de la microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario de Valdelateja, indican que en el manantial Río encontraron coliformes totales en una cantidad de 18UFC/mL sin presencia de *Escherichia coli* por lo cual estos microorganismos no indican contaminación fecal ni riesgo a la salud de los seres humanos pues podrían provenir de otros ambientes (suelo, aguas residuales, vegetales).

Por tanto se puede decir que con excepción de los puntos de donde emerge el agua termal el resto de los sitios muestreados del Balneario El Cachaco contienen coliformes totales en una cantidad que no permite cumplir con las normativas de agua potable, sin embargo como se encuentran en pequeñas cantidades en cada uno de los sitios muestreados y no hay presencia de *Escherichia coli* no constituyen un riesgo sanitario pues pueden provenir de otros hábitats, además se deberían tomar medidas higiénicas correctivas que disminuyan la presencia de coliformes totales.

Finalmente es necesario mencionar que al momento de realizar el recuento de *Escherichia coli* y coliformes totales, el gel de las placas 3M Petrifilm viró a amarillo lo cual indicaría un alto número de microorganismos no-Coliformes como *Pseudomonas*.

Las *Pseudomonas* son bacilos flagelados, rectos, Gram negativos, aerobios estrictos, oxidasa y catalasa positivos, algunas secretan un color amarillo verdoso fluorescente que generalmente son inocuas para el ser humano a excepción de algunas patógenas oportunistas como *Pseudomonas aeruginosa* que afecta a las personas inmunosuprimidas afectando sus vías respiratorias. (Torrico, 2010, pp. 325-326)

Arcos et al. (2005, p.74) mencionan que la *Pseudomonas aeruginosa* no es propia del agua, puede provenir de las heces de los seres humanos y animales por lo que su presencia en el agua se relaciona con la contaminación de la misma, este microorganismo es capaz de sobrevivir por varios meses en aguas a temperatura ambiente; el Real Decreto 742/2013 de los criterios técnico sanitarios de la calidad del agua y del aire de las piscinas de España indica que en estas aguas no debe existir *Pseudomonas aeruginosa* (0 UFC/100mL).

Según De La Rosa y colaboradores (2004, p.535) las *Pseudomonas* son bacterias que se encuentran en aguas superficiales contaminadas con aguas residuales, vegetales y en el suelo, pueden colonizar las aguas minerales naturales pues sobreviven en ambientes oligotróficos, y si están presentes cuando hay ausencia de bacterias indicadoras fecales y patógenas quiere decir que ha existido una contaminación antigua y transitoria por filtraciones de aguas residuales.

3.4 Recuento de *Staphylococcus aureus* presentes en las aguas termales del Balneario El Cachaco.

El recuento de *Staphylococcus aureus* se realizó una vez que las placas 3M Petrifilm Sistema de Recuento Staph Express se inocularon con las muestras de agua termal y se incubaron a 35°C.

Tabla 5-3: Recuento de *Staphylococcus aureus* de los sitios muestreados del Balneario El Cachaco.

SITIO MUESTREADO	Primer muestreo (UFC/mL)	Segundo muestreo (UFC/mL)	Media	Desviación estándar	Varianza
M1	2	0	1	1.4142	2
M2	1	1	1	0	0
M3	1	0	1	0.7071	1
M4	0	2	1	1.4142	2
M5	2	0	1	1.4142	2
RESULTADOS TOTALES	6	3	1	0	0

Realizado por: CORTES Sandra, 2016

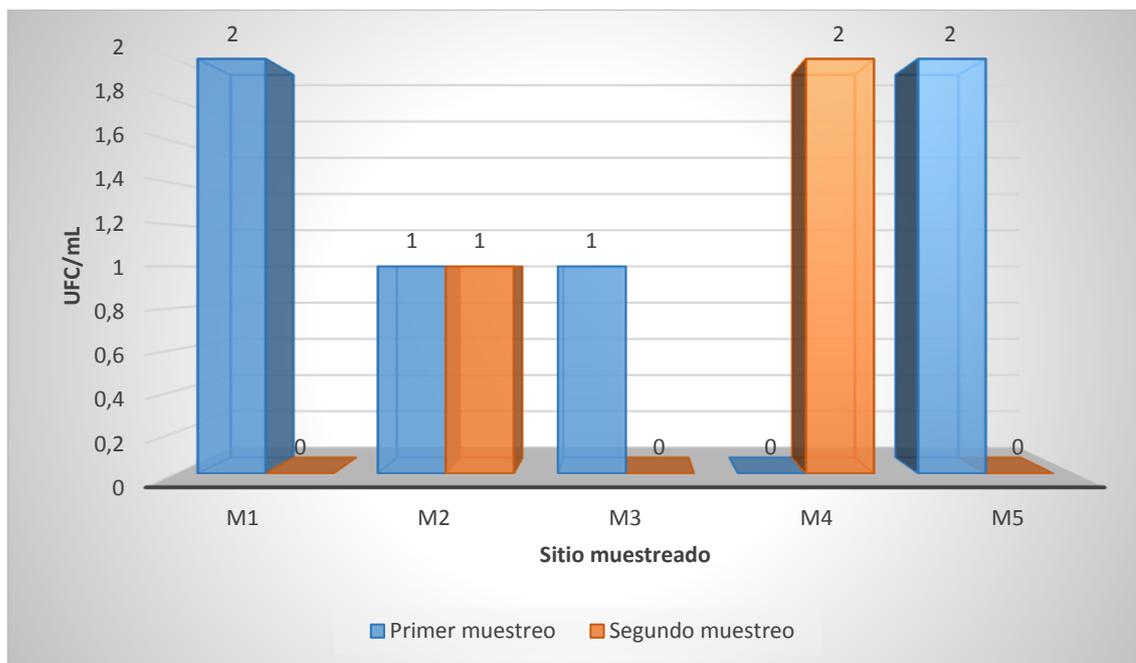


Gráfico 3-3: Recuento de *Staphylococcus aureus* en los sitios muestreados del Balneario El Cachaco en el primer y segundo muestreo.

Realizado por: CORTES Sandra, 2016

El *Staphylococcus aureus* a pesar de formar parte de la microbiota normal de las personas (fosas nasales, piel, perineo, axilas y vagina) puede resultar patógeno en personas hospitalizadas, inmunocomprometidas, personas con heridas en la piel, infecciones, diabetes mellitus, artritis reumatoidea y enfermedades crónicas a las cuales les ocasiona desde enfermedades leves (infecciones de la piel y mucosas) hasta enfermedades de riesgo vital (osteomielitis, meningitis, endocarditis, neumonía, etc). (Guías para la calidad del agua potable, 2006, p.205) (Bustos, 2006, p. 288)

Este microorganismo produce enzimas como las hemolisinas (alfa, beta, gamma), nucleasas, proteasas, lipasas, hialuronidasa y colagenasa que degradan los tejidos locales del huésped para convertirlos en nutrientes para las bacterias, toxinas como la del síndrome del shock tóxico (TSST-1), enterotoxinas estafilocócicas (SE) que afecta el tracto gastrointestinal, toxinas exfoliativas (ETA y ETB) entre otras que ponen en riesgo la salud de las personas. (Guías para la calidad del agua potable, 2006, p.205) (Bustos, 2006, pp. 288-289)

En la tabla 5-3 se muestran los resultados obtenidos del recuento de *Staphylococcus aureus* en cada uno de los sitios muestreados, en el primer muestreo en los puntos M1 y M5 se detectaron el mayor número de colonias crecidas pues estos dos puntos no cuentan con ninguna protección estando expuestos a los factores contaminantes provenientes del ambiente, de los usuarios y de los animales que habitan cerca del lugar.

En el sitio muestreado M4 no hubo presencia de *Staphylococcus aureus* pues este punto de surgencia del agua termal en su mayoría se encontraba protegido del ambiente por una tapa de cemento, en cambio en el segundo muestreo en este mismo sitio se detectó 2 UFC/mL de esta bacteria las cuales tal vez provinieron del aire, mientras que en los dos puntos muestreados de la piscina (M3 y M5) no se detectó presencia de *Staphylococcus aureus*.

Tomando en cuenta los dos muestreos realizados podemos ver en el gráfico 3-3 que el recuento de *Staphylococcus aureus* en cada punto muestreado no supera las 2 UFC/mL las cuales quizás provenían del aire o de las personas que utilizan el balneario, lo cual es alentador ya que el riesgo de que esta bacteria ocasione enfermedades en los usuarios de las aguas termales es casi nulo, sin embargo lo ideal es que no exista presencia de este microorganismo en el agua termal. (Guías para la calidad del agua potable, 2006, p.205)

De La Rosa y colaboradores (2015, p.58) en un estudio microbiológico del agua mineral del Balneario de la Villa de Olmedo indicaron que hubo ausencia de *Staphylococcus aureus*, este resultado se repitió en los estudios realizados en el manantial mineromedicinal del Balneario Puente Viesgo, en las aguas mineromedicinales de los Balnearios de Jaraba y en los manantiales mineromedicinales del Balneario de Alicún de las Torres por tanto cumplen la normativa de aguas de consumo humano, al contrario que en el estudio microbiológico del Balneario El Cachaco en donde sí se detectó la presencia de *Staphylococcus aureus*. (De La Rosa, 2007, pp.260-261) (De La Rosa, 2004, p.535) (De La Rosa, 2009, p.769)

Los resultados obtenidos en las aguas termales del Balneario El Cachaco muestran la presencia aunque en bajas cantidades de *Staphylococcus aureus* (Tabla 5-3 y Gráfico 3-3), lo cual indica que existe alguna fuente de contaminación externa, probablemente proveniente del aire, de los bañistas y de los animales que frecuentan el área; además se deberían instaurar normas de higiene para los usuarios del agua termal y realizar estudios microbiológicos periódicos en el balneario a fin de ir monitoreando la presencia de este microorganismo.

3.5 Recuento de mohos y levaduras presentes en las aguas termales del Balneario El Cachaco.

El conteo de mohos y levaduras se realizó una vez que las placas 3M Petrifilm fueron inoculadas con las diversas muestras de agua termal del Balneario El Cachaco e incubadas a 25°C.

Tabla 6-3: Recuento de mohos y levaduras de los sitios muestreados del Balneario El Cachaco.

SITIO MUESTREADO	Número de muestreo	UFC/mL		TOTAL	Media	Desviación estándar	Varianza
		Levaduras	Mohos				
M1	Primer muestreo	2	0	2	2	0	0
	Segundo muestreo	1	1	2			
M2	Primer muestreo	0	0	0	0	0	0
	Segundo muestreo	0	0	0			
M3	Primer muestreo	1	1	2	3	0.7071	0.5
	Segundo muestreo	3	0	3			
M4	Primer muestreo	1	0	1	2	1.4142	2
	Segundo muestreo	3	0	3			
M5	Primer muestreo	5	2	7	5	3.5355	12.5
	Segundo muestreo	2	0	2			
RESULTADOS TOTALES		18	4	22	2	1.8165	3

Realizado por: CORTES Sandra, 2016

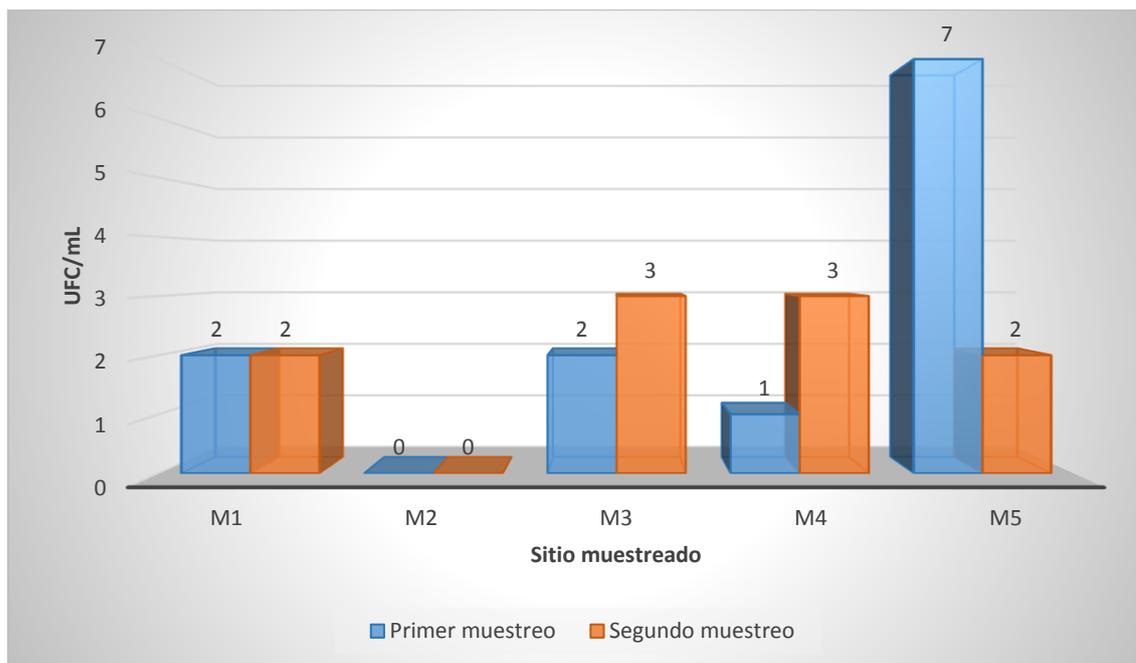


Gráfico 4-3: Resultado total de mohos y levaduras en los puntos muestreados en el primer y segundo muestreo.

Realizado por: CORTES Sandra, 2016

Los mohos y las levaduras están ampliamente distribuidos en la naturaleza por lo que pueden ser encontrados en las aguas termales. (Camacho, 2009)

Los resultados de la tabla 6-3 muestran que existió una escasa presencia de levaduras y mohos en las muestras de agua termal del Balneario El Cachaco, se detectó 18 UFC/mL de levaduras y 4 UFC/mL de mohos; considerando los promedios de los dos muestreos realizados el sitio que contenía más cantidad de mohos y levaduras fue el M5 mientras que en el sitio M2 hubo ausencia de los mismos.

Tomando en cuenta el total de mohos y levaduras (Gráfico 4-3) podemos ver que en el primer muestreo el sitio que contenía la mayor cantidad de los mismos fue el M5 (7 UFC/mL) en cambio en el segundo muestreo fueron los puntos M3 y M4 (3 UFC/mL), además en ambos muestreos coincide que el sitio muestreado con menor cantidad de mohos y levaduras fue el M2.

Andueza (2014) menciona que las elevadas cantidades de mohos y levaduras en el agua indican contaminación ambiental y problemas de higiene, la norma técnica colombiana NTC 813 de agua potable (2007) menciona que el número de colonias de hongos o levaduras no debe sobrepasar de 1 en 5mL y de 10 en 50mL además señala que ninguna muestra debe tener hongos o levaduras patógenas, de acuerdo a esto el punto de muestreo M2 es el único que cumple con la norma en los dos muestreos realizados.

De La Rosa y Mosso (2000, p.157) señalan que en las aguas minerales termales hay bajas cantidades de hongos, en especial mohos de los géneros *Penicillium*, *Aspergillus* y *Alternaria* que no influyen de manera negativa en la calidad sanitaria del agua, es así que diversos autores han reportado la presencia de hongos en bajas proporciones en sus estudios microbiológicos de fuentes termales corroborando que no constituyen un riesgo sanitario para las personas.

Mosso et al. (2006, p.298) mencionan que en las aguas de los manantiales mineromedicinales del Balneario Cervantes pudieron aislar una cantidad inferior a 20/100mL de hongos filamentosos de los géneros *Penicillium*, *Acremonium*, *Mucor* y *Aureobasidium* e indicaron que los hongos en las aguas subterráneas se encuentran en poca cantidad o no se los detecta, sin embargo se los ha detectado en manantiales hipotermas y aguas subterráneas de uso público.

De igual manera Mosso et al. (2008, pp.516-517) en un estudio microbiológico de los manantiales mineromedicinales del Balneario de Valdelateja encontraron 160 UFC/100mL de hongos filamentosos de los géneros *Penicillium*, *Fusarium* y *Cladosporium* en el manantial Río y 5UFC/100mL de hongos filamentosos en el manantial Termas.

En la investigación realizada por Mosso y De La Rosa (2011,p.63) en los manantiales mineromedicinales del Balneario de Baños de la Concepción de Villatoya indicaron que se encontró 26 UFC/100mL de hongos filamentosos de los géneros *Penicillium*, *Acremonium* y *Alternaria* en el manantial Las Cuevas y 5UFC/100mL de hongos filamentosos en el manantial Las Bombas, además indican que en las aguas minerales la presencia de mohos es poco frecuente, que estos provienen del suelo y que se adaptan a vivir en esas condiciones.

De La Rosa et al. (2007, p.262) en un estudio realizado acerca de la microbiología del manantial mineromedicinal del Balneario Puente Viesgo, señalan que han encontrado hongos filamentosos del género *Penicillium* en baja proporción (4 UFC/100mL).

Además De La Rosa et al. (2009, p.771) en una investigación microbiológica de los manantiales mineromedicinales del Balneario de Alicún de las Torres, mencionan que encontraron hongos filamentosos de los géneros *Penicillium*, *Fusarium* y *Alternaria* procedentes del suelo en el manantial Baños de Abajo (600 UFC/100mL) y 2 UFC/100mL de hongos filamentosos en el manantial Baños; también indican que en este tipo de aguas la existencia de mohos era infrecuente sin embargo se los ha podido detectar en otras aguas mineromedicinales pues se adaptan a las condiciones de las mismas.

De La Rosa y colaboradores (2001, pp.8-9) en una investigación en el agua mineromedicinal del Balneario El Paraíso de Manzanera, detectaron una cantidad pequeña de hongos filamentosos 10/100mL de la especie *Chrysonilia sitophila* proveniente de vegetales además de una ausencia de levaduras, cuyos resultados son típicos de aguas no contaminadas.

Por otro lado De La Rosa y colaboradores (2004, p.536) en su estudio acerca de la microbiología de las aguas mineromedicinales de los Balnearios de Jaraba, detectaron hongos filamentosos especialmente del género *Penicillium* en una cantidad de <10/100mL además de otros géneros como *Acremonium*, *Cladosporium*, *Chrysosporium*, *Curvularia*, *Trichoderma* y dos cepas de levaduras en el Balneario La Virgen; también indican que los hongos son muy ubicuos, que los mohos y levaduras han sido detectados en aguas termales y en aguas minerales envasadas.

En cambio De La Rosa y colaboradores (2015, p.59) en una investigación microbiológica del agua mineral del Balneario de la Villa de Olmedo no detectaron hongos en las muestras de agua termal.

Por tanto se puede decir que con excepción del sitio muestreado M2 la cantidad de mohos y levaduras en el Balneario El Cachaco es elevado, estos hongos al ser ubicuos pueden haber provenido del suelo, los bañistas y de la vegetación que rodea a cada sitio muestreado, los cuales estarían generando una decadencia de la calidad sanitaria del lugar; además se recomienda tomar medidas higiénicas correctivas que permitan conservar el ecosistema y resguardar la salud de la población.

3.6 Recuento de las colonias que fermentaron y que no fermentaron la lactosa y el manitol respectivamente.

Tabla 7-3: Recuento de las colonias que fermentaron y no fermentaron la lactosa y el manitol en cada uno de sus respectivos agares.

SITIO	Número de muestreo	UFC/mL			
		Agar eosina azul de metileno		Agar manitol salado	
		Lactosa (+)	Lactosa (-)	Manitol (+)	Manitol (-)
M1	Primer muestreo	220	160	0	250
	Segundo muestreo	20	0	0	0
M2	Primer muestreo	0	0	0	60
	Segundo muestreo	20	280	720	880
M3	Primer muestreo	20	80	0	60
	Segundo muestreo	10	40	0	0
M4	Primer muestreo	0	0	0	0
	Segundo muestreo	0	0	0	0
M5	Primer muestreo	40	230	0	0
	Segundo muestreo	0	0	0	0
Recuento total de la fermentación		33	79	72	125

Realizado por: CORTES Sandra, 2016

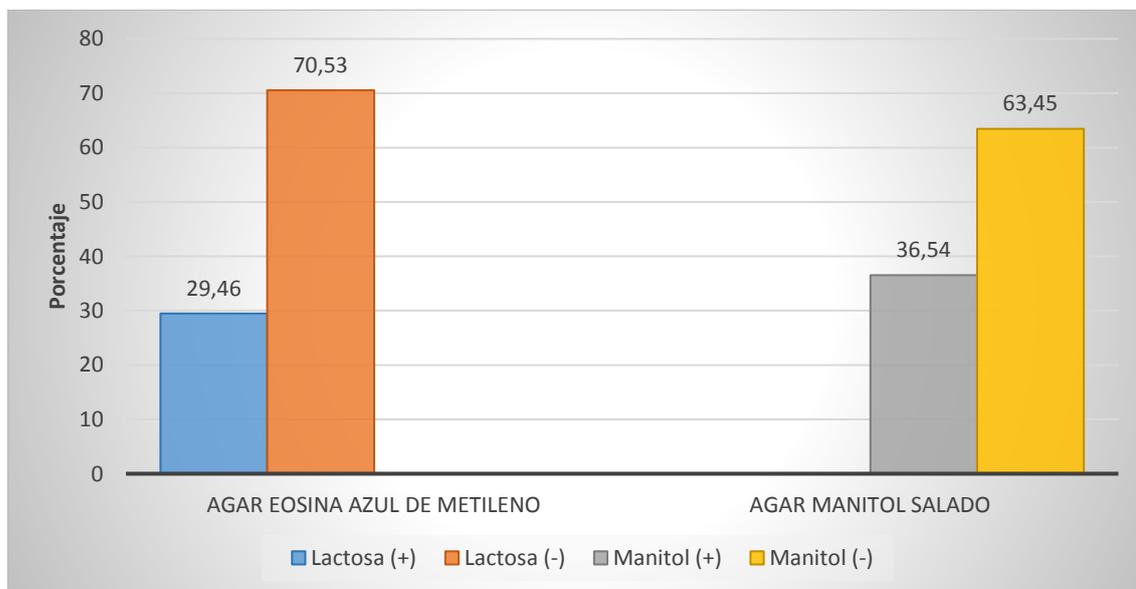


Gráfico 5-3: Porcentaje total de las colonias que fermentaron y no fermentaron la lactosa y manitol en sus respectivos agares.

Realizado por: CORTES Sandra, 2016

La siembra de las muestras de agua termal del Balneario El Cachaco en los agares eosina azul de metileno y manitol salado nos permitió conocer la cantidad de colonias que fermentaron y que no fermentaron la lactosa y el manitol respectivamente de acuerdo a la coloración que presentaban las colonias en cada agar.

En la tabla 7-3 se indica que en el primer muestreo la mayor cantidad de colonias que fermentaron la lactosa provinieron del sitio muestreado M1 mientras que la mayoría de colonias que no fermentaron la lactosa procedían del sitio muestreado M5; en cambio en el segundo muestreo la mayoría de colonias que fermentaron la lactosa provinieron de los sitios muestreados M1 y M2 y la mayor cantidad de colonias que no fermentaron la lactosa procedían del sitio muestreado M2.

Las colonias que fermentaron la lactosa en su mayoría presentaron un centro oscuro azulado con una periferia rosada, otras colonias eran negro azuladas con brillo metálico verde (*Escherichia coli*), las colonias que no fermentaron la lactosa eran incoloras probablemente de los géneros *Salmonella*, *Proteus*, *Pseudomonas* y *Shigella*. (Laboratorios Britania S.A., 2010) (Becton Dickinson, 2013)

En la tabla 7-3 también se indica que en el primer muestreo no existieron colonias que fermentaron el manitol mientras que la mayoría de colonias que no fermentaron el manitol provenían del sitio muestreado M1; en el segundo muestreo únicamente en el punto muestreado M2 se evidenció la presencia de colonias que fermentaron el manitol y al mismo tiempo en este sitio hubo una gran cantidad de colonias que no fermentaron el manitol.

Las colonias que fermentaron el manitol eran de color amarillo rodeadas de una zona amarilla como ocurre en el caso de los estafilococos coagulasa positivos (*Staphylococcus aureus*) mientras que las colonias que no fermentaron el manitol eran de color rojo rodeadas de una zona roja como en el caso de los estafilococos coagulasa negativos (*Staphylococcus epidermidis*). (Casado, 2012, p.23) (Laboratorios Britania S.A., 2015) (Becton Dickinson, 2013)

Tomando en cuenta el porcentaje total de las colonias que fermentaron y no fermentaron la lactosa y el manitol, se puede decir que un 29.46% fermentaron la lactosa y un 70.53% no lo hicieron, en cambio en el agar manitol salado el 36.54% fermentaron el manitol y un 63.45% no fermentaron el manitol. (Gráfico 5-3)

Cabe mencionar que las colonias crecidas en el agar eosina azul de metileno generalmente pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* las cuales pudieron provenir del suelo, vegetación, de las vías respiratorias superiores, piel o de la flora intestinal de los usuarios del balneario o de los animales; en cambio las colonias crecidas en el agar manitol salado generalmente pertenecen al género *Staphylococcus* las cuales pudieron proceder de la flora normal de la piel y mucosas (*S. epidermidis*), de las fosas nasales, región perineal y nasofaringe (*S. aureus*) o de la mucosa del aparato genitourinario (*S. saprophyticus*) de las personas que acuden al balneario. (Puerta y Mateos, 2010, p.3426) (Merino y Losch, 2010) (Guías para la calidad del agua potable, 2006, p.205) (Chans, 2004)

3.7 Morfología macroscópica de las colonias bacterianas crecidas en el agar Mueller Hinton.

Tabla 8-3: Morfología macroscópica de los clones aislados del agua termal del Balneario El Cachaco.

Sitio muestreado	Número de clon	Origen	Morfología						
			Tamaño	Forma	Color	Bordes	Consistencia	Elevación	Superficie
M1	1-4	E.M.B.	Mediano	Circular	Blanco cremoso	Enteros	Creмоса	Elevada	Lisa
M1	1-7	E.M.B.	Grande	Circular	Blanco cremoso	Enteros	Creмоса	Elevada	Lisa
M5	1-18	E.M.B.	Mediano	Circular	Blanco cremoso	Enteros	Creмоса	Elevada	Lisa
M1	2-2	RAC	Grande	Circular	Creмосо amarillo	Enteros	Creмоса	Elevada	Lisa
M1	2-5	RAC	Muy pequeño	Circular	Blanco cremoso	Enteros	Creмоса	Elevada	Lisa
M3	2-6	RAC	Mediano	Circular	Creмосо amarillo	Enteros	Creмоса	Elevada	Lisa
M3	2-11	RAC	Grande	Circular	Blanco cremoso algo amarillo	Enteros	Creмоса	Elevada	Lisa
M3	2-12	RAC	Grande	Circular	Blanco cremoso	Enteros	Creмоса	Elevada	Lisa
M1	3-1	RAC	Pequeño	Circular	Blanco cremoso algo amarillo	Ondulados	Creмоса	Elevada	Rugosa
M1	3-7	RAC	Pequeño	Circular	Blanco cremoso	Enteros	Creмоса	Elevada	Lisa
M1	3-11	RAC	Pequeño	Circular	Blanco cremoso	Enteros	Creмоса	Elevada	Lisa
M1	3-17	RAC	Pequeño	Circular	Blanco cremoso	Enteros	Creмоса	Elevada	Lisa
M5	3-38	RAC	Mediano	Circular	Blanco cremoso	Enteros	Creмоса	Elevada	Lisa
M5	3-49	RAC	Mediano	Circular	Creмосо	Enteros	Creмоса	Elevada	Lisa
M1	3-62	EC	Mediano	Circular	Blanco cremoso algo amarillo	Enteros	Creмоса	Elevada	Lisa
M3	4-2	Manitol salado	Pequeño	Circular	Mostaza	Enteros	Creмоса	Elevada	Lisa
M5	4-7	Manitol salado	Mediano	Circular	Mostaza	Enteros	Creмоса	Elevada	Lisa

M2	4-11	Manitol salado	Pequeño	Circular	Cremoso amarillento	Irregulares	Cremosa	Elevada	Lisa
M2	I-25	RAC	Pequeño	Circular	Blanco algo amarillento	Irregulares	Dura	Plana	Rugosa
M1	I-29	RAC	Pequeño	Circular	Blanco cremoso	Enteros	Cremosa	Elevada	Lisa
M2	I-39	RAC	Pequeño	Circular	Blanco algo amarillento	Irregulares	Dura	Plana	Rugosa
M4	I-42	RAC	Mediano	Circular	Blanco cremoso algo amarillento	Enteros	Cremoso	Elevada	Lisa
M2	I-46	E.M.B.	Pequeño	Circular	Blanco amarillento	Ondulados	Cremoso	Elevada	Rugosa
M5	I-60	STX	Muy pequeño	Circular	Blanco	Irregulares	Mucosa	Plana	Lisa
M5	6-42	STX	Pequeño	Circular	Blanco cremoso algo amarillento	Enteros	Mucosa	Elevada	Lisa

E.M.B.= Agar eosina azul de metileno

RAC=Placa 3M Petrifilm Recuento Rápido de Aerobios

EC= Placa 3M Petrifilm para Recuento de *E. coli* y Coliformes

STX = Placa 3M Petrifilm Sistema de Recuento Staph Express

Realizado por CORTES Sandra, 2016

Como una forma inicial de identificar y diferenciar los microorganismos se realizó la observación de las características macroscópicas de las colonias, cada colonia posee un tamaño, forma, color, bordes, consistencia, elevación, superficie entre otras características que varían según la especie bacteriana, el medio de cultivo y las condiciones de incubación. (Fernández, 2010, p.4) (Díaz, 2009)

En la tabla 8-3 se presentan los resultados de siete características macroscópicas observadas en las colonias, de todas las colonias las más preponderantes en cuanto al tamaño fueron las pequeñas con un 44%, seguidas de las medianas con un 32%, grandes con un 16% y las muy pequeñas con un 8%; en cuanto a la forma el 100% de las colonias fueron circulares.

El porcentaje mayoritario de colonias que se encontraron fueron blancas cremosas (40%), seguido de las blancas cremosas algo amarillentas (20%), cremosas amarillentas (12%), mostazas (8%), blancas algo amarillentas (8%), cremosas (4%) y blancas (4%), de éstas dos últimas solo se encontró 1 colonia de cada

tipo, con relación a los bordes predominaron los enteros (76%), luego los irregulares (16%) y los ondulados (8%), en base a la consistencia la mayoría de colonias fueron cremosas (84%), seguido de las duras (8%) y las mucosas (8%).

Tomando en consideración la elevación el 88% de las colonias tuvieron una considerable elevación y un 12% de ellas fueron planas, finalmente de acuerdo a la superficie el 84% de las colonias fueron lisas y el 16% rugosas.

3.8 Morfología microscópica de todos los clones bacterianos aislados de las aguas termales del Balneario El Cachaco.

Para determinar la morfología microscópica se realizó una tinción Gram de los 146 clones bacterianos aislados y su posterior observación a través del microscopio con el lente de 100X.

Tabla 9-3: Morfología microscópica de los clones bacterianos aislados de las aguas termales del Balneario El Cachaco.

Morfología y tinción Gram	Primer muestreo	Segundo muestreo	Total	Porcentaje
Cocos Gram (+)	83	32	115	78.76%
Cocos Gram (-)	12	1	13	8.9%
Bacilos Gram (+)	2	3	5	3.42%
Bacilos Gram (-)	5	3	8	5.47%
Clones contaminados	1	4	5	3.42%

Realizado por: CORTES Sandra, 2016

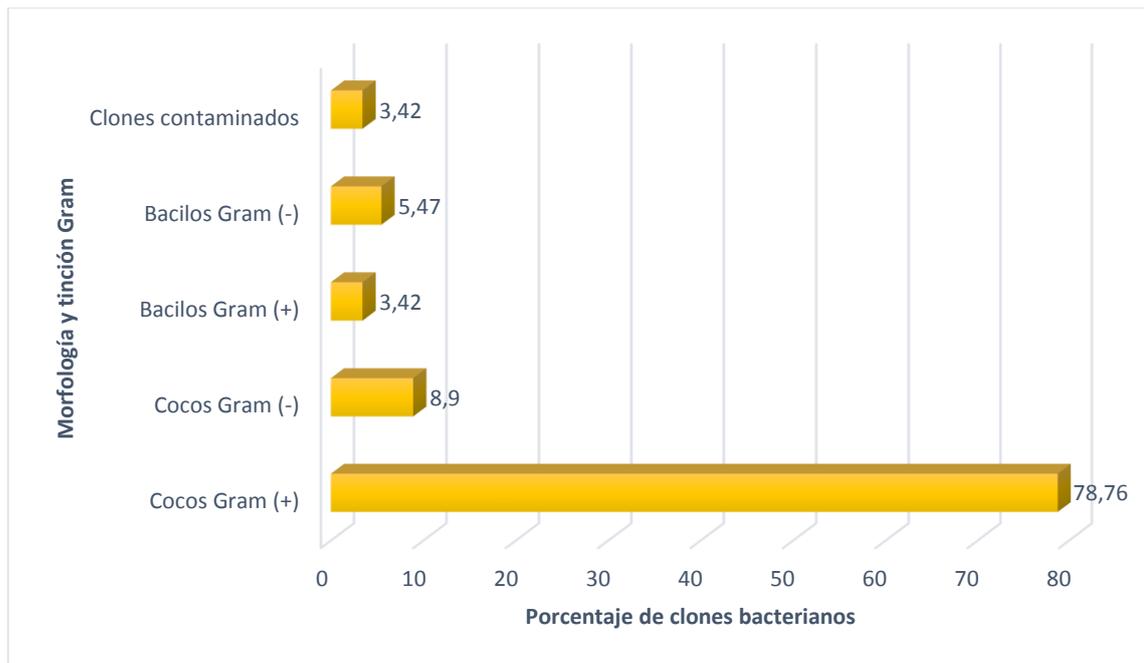


Gráfico 6-3: Porcentaje de clones bacterianos según su morfología y tinción Gram.

Realizado por: CORTES Sandra, 2016

En la tabla 9-3 se muestra los resultados de los clones bacterianos según su morfología y tinción Gram, de acuerdo a la tinción Gram existió un predominio de microorganismos Gram positivos con un 82.18% sobre un 14.37% de microorganismos Gram negativos, en cuanto a la morfología el 87.66% correspondieron a los cocos y el 8.89% a los bacilos.

En el primer muestreo los microorganismos que se encontraron en menor cantidad fueron los bacilos Gram positivos en cambio en el segundo muestreo fueron los cocos Gram negativos de los cuales solo se encontró un clon bacteriano; además en ambos muestreos hubo predominio de los cocos Gram positivos.

En el gráfico 6-3 se indica los porcentajes de los diferentes tipos de clones bacterianos que se encontraron en las aguas termales del Balneario El Cachaco, en donde se puede ver que hubo un predominio de cocos Gram positivos con un 78.76% (115 clones), seguido de un 8.9% (13 clones) de cocos Gram negativos, 5.47% (8 clones) de bacilos Gram negativos, 3.42% (5 clones) de bacilos Gram positivos y un 3.42% de clones bacterianos contaminados que al observarlos al microscopio se detectó una mezcla de cocos y bacilos por lo cual fueron excluidos del estudio microbiológico

Cabe indicar que de los 146 clones bacterianos aislados de las aguas termales del Balneario El Cachaco se seleccionaron 25 para su posterior identificación, de acuerdo a lo cual los cocos Gram

positivos (20 clones) correspondieron a los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Micrococcus*, el bacilo Gram positivo (1 clon) era del género *Corynebacterium* y los bacilos Gram negativos (4 clones) de los géneros *Campylobacter* y *Pseudomonas*.

Según De La Rosa y Mosso (2000, pp.153-156) en las aguas hipertermales predominan las bacterias Gram positivas en cambio en las aguas mesotermas predominan los bacilos Gram negativos y los cocos Gram positivos diferencia debida a que las bacterias Gram positivas son más resistentes al calor, estos resultados coinciden con los obtenidos para el Balneario El Cachaco en donde hubo un predominio de bacterias Gram positivas (cocos Gram positivos y bacilos Gram positivos) las cuales en su mayoría eran cocos.

Además De La Rosa y Mosso (2000, p.156) mencionan que en las aguas minerales termales se ha detectado de manera frecuente cocos Gram positivos de los géneros *Staphylococcus* y *Micrococcus* pues estos soportan elevadas concentraciones de sal, estos resultados coinciden con los encontrados en las aguas termales del Balneario El Cachaco en donde hubo un predominio de cocos Gram positivos en especial del género *Staphylococcus* así como también del género *Micrococcus*. Entre otros géneros que se han identificado en las aguas minerales termales se encuentran las *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Acinetobacter* y *Arthrobacter*.

Por otro lado a diferencia de los resultados obtenidos en las aguas termales del Balneario El Cachaco varios autores en sus investigaciones reportan el predominio de los bacilos Gram negativos, así tenemos que Mosso y De La Rosa (2011, p.64) en un estudio microbiológico de los manantiales mineromedicinales del Balneario de Baños de la Concepción de Villatoya, mencionaron que de los 3 manantiales termales aislaron 135 cepas bacterianas de las cuales un 60% eran bacilos Gram negativos, 29.6% eran bacilos Gram positivos y 10.4% eran cocos Gram positivos.

En la misma investigación Mosso y De La Rosa (2011, pp.65-66) señalan que de los bacilos Gram negativos el género *Pseudomonas* ha sido uno de los que se ha presentado de manera frecuente, esto debido a que estas bacterias pueden sobrevivir y multiplicarse en las aguas mineromedicinales gracias a que no son exigentes desde el punto de vista nutricional y que para su metabolismo usan varias fuentes de carbono; en cuanto a los bacilos Gram positivos indican que se los ha detectado en los manantiales La Fuente y Las Cuevas, estas bacterias pertenecían al género *Corynebacterium* y a otros como *Arthrobacter* y *Bacillus* procedentes del suelo, cabe mencionar que en el Balneario El Cachaco también se encontraron bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Corynebacterium*.

Mosso y De La Rosa (2011, p.66) también indican que los cocos Gram positivos pertenecían en su mayoría al género *Staphylococcus* los cuales son bacterias ubicuas, que mostraron ser halófilas facultativas y soportar altas concentraciones de sal, el otro género que han encontrado es el

Micrococcus, estos géneros también fueron detectados en las aguas termales del Balneario El Cachaco. Por último afirman que existen diferencias en la microbiota de los tres manantiales estudiados ya que en el manantial Las Bombas predominaron los bacilos Gram negativos mientras que en los manantiales La Fuente y Las Cuevas predominaron las bacterias Gram positivas.

De La Rosa et al. (2004, pp.532-534) en un estudio de la microbiología de las aguas mineromedicinales de los Balnearios de Jaraba, mencionaron que de las 244 cepas aisladas un 65% correspondían a bacilos Gram negativos, un 17.3% a cocos Gram positivos y un 13.8% a bacilos Gram positivos, con predominio de los bacilos Gram negativos en todos los manantiales. Entre los bacilos Gram negativos encontraron especies del género *Pseudomonas*, de los cocos Gram positivos han encontrado principalmente bacterias del género *Staphylococcus* que desde el ambiente pudieran haber llegado a las aguas termales mediante el aire, suelo o lluvia y entre uno de los bacilos Gram positivos que han detectado está el género *Corynebacterium*.

En la investigación realizada por Mosso y colaboradores (2008, pp.512-515) acerca de la microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario de Valdelateja, se encontró que de las 114 cepas bacterianas aisladas un 83.3% eran bacilos Gram negativos algunos del género *Pseudomonas*, un 22.8% de bacilos Gram positivos de los géneros *Bacillus* y *Corynebacterium* procedentes del suelo y de cocos Gram positivos de los géneros *Micrococcus* y *Staphylococcus*; por último mencionaron que tanto en el manantial Termas como en el manantial Río predominaron las bacterias Gram negativas.

Por otro lado De La Rosa et al. (2015, pp.59-61) en un estudio microbiológico del agua mineral del Balneario Villa de Olmedo mencionaron que de las 35 cepas bacterianas aisladas un 85.7% correspondían a los bacilos Gram negativos algunos del género *Pseudomonas* y un 14.3% a los cocos Gram positivos de los géneros *Staphylococcus* y *Vagococcus*.

De La Rosa y colaboradores (2007, pp.258-260) en un estudio microbiológico del manantial mineromedicinal del Balneario Puente Viesgo, indicaron que de las 37 cepas bacterianas aisladas 62.2% correspondían a los bacilos Gram negativos varios de ellos pertenecientes al género *Pseudomonas*, 18.9% a los bacilos Gram positivos y un 18.9% a los cocos Gram positivos de los géneros *Micrococcus* y *Staphylococcus*.

En cambio De La Rosa et al. (2001, pp.9-11) en un estudio microbiológico del agua mineromedicinal del Balneario El Paraíso de Manzanera mencionaron que de las 34 cepas aisladas hubo un predominio de los bacilos Gram positivos (64.7%) de géneros como *Bacillus* y *Corynebacterium*, seguido de los cocos Gram positivos (32.3%) en especial del género *Staphylococcus* y de una sola cepa de bacilos Gram negativos.

Finalmente podemos decir que en el Balneario El Cachaco predominaron los cocos Gram positivos, además de que la variedad de especies que existen en un hábitat depende de la relación de los organismos con el ambiente y que en todos los estudios anteriormente mencionados se han detectado bacterias de géneros que también fueron encontrados en las aguas termales del Balneario El Cachaco, en donde además se encontraron géneros no mencionados en otros estudios microbiológicos de aguas mineromedicinales como el *Streptococcus* y *Campylobacter*.

3.9 Pruebas bioquímicas para la identificación de cocos Gram positivos

Los resultados de las pruebas bioquímicas que se realizaron a los cocos Gram positivos se muestran en las tablas 10-3, 11-3 y 12-3.

Tabla 10-3: Pruebas bioquímicas para la identificación de los cocos Gram positivos de las aguas termales del Balneario El Cachaco.

		NÚMERO DE CLON BACTERIANO								
		1-4	1-18	2-2	2-5	2-6	2-12	3-1	3-7	3-11
Morfología y tinción Gram		Cocos Gram (+)	Cocos Gram (+)	Cocos Gram (+)	Cocos Gram (+)	Cocos Gram (+)	Cocos Gram (+)	Cocos Gram (+)	Cocos Gram (+)	Cocos Gram (+)
Catalasa		+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidasa		-	-	-	-	+	-	-	-	-
OF		Oxidativo	Inerte	Fermentativo	Oxidativo	Fermentativo	Oxidativo	Inerte	Inerte	Oxidativo
Agar Sangre	Crecimiento	Blanco cremoso grisáceo >1mm	Blanco algo transparentoso >1mm	Blanco cremoso >1mm	Blanco cremoso >1mm	Blanco cremoso >1mm	Creimoso transparentoso <1mm	Blanco cremoso 1mm	Blanco transparentoso >1mm	Blanco cremoso >1mm
	Hemólisis	γ	γ	γ	γ	α	γ	β	β	γ
Agar Manitol Salado	Crecimiento	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno
	Fermentación	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno
Coagulasa		-	-	-	-	-	-	-	-	-
Crecimiento en NaCl al 6.5%		-	-	-	-	-	-	-	-	-
Medio Kligler	Glucosa /Lactosa	Glucosa	Glucosa	Glucosa	Glucosa	Glucosa	Glucosa	Glucosa	Glucosa	Glucosa
	Gas	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Medio Úrea		-	+	+	-	-	-	+	-	-

	Diferenciación por la sensibilidad o resistencia antibiótica	NA 30ug	S	S	S	S	R	S	S	S	S	
		OP 5ug	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
		B 0.04U	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
		NV 5ug	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R

R=Resistente, S=Sensible, NA=ácido nalidíxico, OP=optoquina, B=bacitracina, NV=novobiocina.

Realizado por: CORTES Sandra, 2016

Tabla 11-3: Pruebas bioquímicas para la identificación de los cocos Gram positivos de las aguas termales del Balneario El Cachaco.

		NÚMERO DE CLON BACTERIANO									
		3-17	3-62	4-2	4-7	4-11	1-25	1-29	1-39	1-42	
PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN	Morfología y tinción Gram	Cocos Gram (+)	Cocos Gram (+)	Cocos Gram (+)	Cocos Gram (+)	Cocos Gram (+)	Cocos Gram (+)	Cocos Gram (+)	Cocos Gram (+)	Cocos Gram (+)	
	Catalasa	+	+	+	+	+	-	+	-	+	
	Oxidasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	OF	Inerte	Inerte	Inerte	Inerte	Inerte	Fermentativo	Inerte	Inerte	Fermentativo	
	Agar Sangre	Crecimiento	Creimoso transparentoso 1mm	Creimoso transparentoso <1mm	Creimoso amarillento 1mm	Creimoso amarillo claro <1mm	Blanco cremoso 1mm	Creimoso transparentoso 1mm	Creimoso grisáceo transparentoso <1mm	Creimoso transparentoso apenas amarillento <1mm	Blanco cremoso >1mm
		Hemólisis	γ	γ	γ	γ	γ	γ	β	β	γ
	Agar Manitol Salado	Crecimiento	Ninguno	Ninguno	Rojo	Rojo	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Rojo	Amarillo
		Fermentación	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Amarillo
	Coagulasa		-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Crecimiento en NaCl al 6.5%		-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Medio Kligler	Glucosa /Lactosa	Glucosa	Glucosa	Glucosa	Glucosa	Glucosa	Glucosa/ Lactosa	Glucosa	Glucosa/ Lactosa	Glucosa/ Lactosa
		Gas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-

	Medio Úrea		-	-	+	+	-	-	-	-	
	Diferenciación por la sensibilidad o resistencia antibiótica	NA 30ug	S	S	R	R	R	R	S	R	R
		OP 5ug	R	R	R	R	R	R	R	R	R
		B 0.04U	R	R	S	R	S	R	R	R	R
		NV 5ug	R	R	S	S	S	S	R	S	R

R=Resistente, S= Sensible, NA=ácido nalidíxico, OP=optoquina, B=bacitracina, NV=novobiocina.

Realizado por: CORTES Sandra, 2016

Tabla 12-3: Pruebas bioquímicas para la identificación de los cocos

Gram positivos de las aguas termales del Balneario El Cachaco.

		NÚMERO DE CLON BACTERIANO		
		I-46	I-60	
PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN	Morfología y tinción Gram		Cocos Gram (+)	Cocos Gram (+)
	Catalasa		-	+
	Oxidasa		-	-
	OF		Fermentativo	Fermentativo
	Agar Sangre	Crecimiento	Creimoso transparentoso 1mm	Blanco cremoso 1mm
		Hemólisis	γ	β
	Agar Manitol Salado	Crecimiento	Rojo	Rojo
		Fermentación	Ninguno	Ninguno
	Coagulasa		-	-
	Crecimiento en NaCl al 6.5%		-	-
	Medio Kligler	Glucosa /Lactosa	Glucosa	Glucosa
		Gas	-	-
		H ₂ S	-	-
	Medio Úrea		-	+

	Diferenciación por la sensibilidad o resistencia antibiótica	NA 30ug	S	S
		OP 5ug	R	R
		B 0.04U	R	R
		NV 5ug	R	S

R=Resistente, S=Sensible, NA=ácido nalidíxico, OP=optoquina, B=bacitracina, NV=novobiocina.

Realizado por: CORTES Sandra, 2016

De los 25 clones bacterianos aislados del primer y segundo muestreo 20 correspondieron a cocos Gram positivos, con respecto a la prueba de la catalasa un 85% de aislados bacterianos dieron un resultado positivo pudiendo pertenecer a la familia *Micrococcaceae* mientras que un 15% dieron un resultado negativo lo que indicó que no poseían la enzima catalasa y que podrían pertenecer a los géneros *Streptococcus spp.* o *Enterococcus spp.* (Fernández, 2010, p.6)

En relación a la prueba de la oxidasa el 5% de aislados bacterianos dieron un resultado positivo y el 95% dieron un resultado negativo por tanto se puede decir que la mayoría de clones no poseían enzimas oxidasas; con respecto a la prueba de la oxidación fermentación el 20% de aislados bacterianos oxidaron el carbohidrato, el 30% fermentaron el hidrato de carbono y el 50% fueron inertes ya que no metabolizaron el azúcar ni por vía oxidativa ni fermentativa.

La siembra de los aislados bacterianos en el agar sangre no solo permitió observar sus características macroscópicas sino también el tipo de hemólisis, el 70% de clones bacterianos presentaron gamma hemólisis, el 25% beta hemólisis y el 5% alfa hemólisis.

Luego de la siembra de los aislados bacterianos en el agar manitol salado se detectó que el 25% de ellos originaron colonias rojas rodeadas de una zona roja como ocurre en el caso del *Staphylococcus epidermidis*, en cambio el 5% de los clones produjeron fermentación del manitol con crecimiento de colonias amarillas rodeadas de una zona amarilla como generalmente ocurre en el caso del *Staphylococcus aureus*. (Casado, 2012, p.23) (Laboratorios Britania S.A., 2015) (Becton Dickinson, 2013)

Las pruebas de la coagulasa y del crecimiento en caldo hipersalino al 6.5% dieron negativas para todos los clones bacterianos; mediante la siembra en el medio Kligler se pudo determinar que el 85% de los aislados bacterianos fermentaron la glucosa y el 15% fermentaron la glucosa y la lactosa, además el 5% de los clones bacterianos produjeron gas. En relación a la prueba de la úrea el 70% de aislados bacterianos mostraron un resultado negativo y el 30% un resultado positivo ya que desdoblaron la úrea.

Finalmente se realizaron las pruebas de sensibilidad a la bacitracina, ácido nalidíxico, optoquina y novobiocina de cada uno de los clones bacterianos para de esta manera facilitar la diferenciación, en base a la sensibilidad o resistencia que muestran cada uno de los aislados bacterianos a esos antibióticos.

3.10 Pruebas bioquímicas para la identificación del bacilo Gram positivo de las aguas termales del Balneario El Cachaco.

Tabla 13-3: Pruebas bioquímicas para la identificación del bacilo Gram positivo de las aguas termales del Balneario El Cachaco.

N°	PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN												
	Morfología y tinción Gram	Catalasa	Oxidasa	O F	Agar Sangre		Agar Manitol Salado		Agar E.M.B.	Agar MacConkey	Hidrólisis de la gelatina	Hidrólisis del almidón	Kligler: Glucosa SIM: Movilidad, indol, H ₂ S (-) Úrea: (-) Citrato: (+)
					Crecimiento	Hemólisis	Crecimiento	Fermentación					
6-42	Bacilos Gram (+)	+	-	I	Blanco cremoso <1mm	γ	Colonias rojas	-	No hubo crecimiento	No hubo crecimiento	-	-	

I=Inerte

Realizado por: CORTES Sandra, 2016

De los 25 clones bacterianos aislados uno de ellos fue un bacilo Gram positivo, el cual resultó ser catalasa positivo es decir que la bacteria poseía esta enzima que le permitió descomponer el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular; en cuanto a la prueba de la oxidasa el resultado fue negativo por tanto el microorganismo no contenía la enzima oxidasa. En relación a la prueba de la oxidación fermentación este clon bacteriano resultó inerte es decir que no metabolizó el azúcar ni por vía oxidativa ni fermentativa; en cuanto al agar sangre se produjo un crecimiento de colonias blancas cremosas menores de 1mm de diámetro sin presencia de hemólisis. (Tabla 13-3).

En el agar manitol salado se produjo un crecimiento abundante de colonias rojas con ausencia de fermentación del manitol, no hubo crecimiento ni en el agar eosina azul de metileno ni en el agar MacConkey ya que estos medios de cultivo son selectivos para el aislamiento y diferenciación de bacilos Gram negativos e inhiben el crecimiento de bacterias Gram positivas, este clon bacteriano no hidrolizó la gelatina pues alrededor del inóculo se formó un precipitado de color blanco que se originó de la reacción de la gelatina con el reactivo cloruro mercurico ácido. (Tabla 13-3).

Por otro lado la bacteria tampoco poseía la enzima amilasa que hidroliza el almidón ya que alrededor del inóculo se presentó un color azul-pardo. En relación al agar Kligler este clon bacteriano fermentó la glucosa, dio una prueba positiva para el citrato, negativa para la úrea y de acuerdo a la prueba realizada en el medio de cultivo SIM la bacteria no presentó movilidad, no produjo ácido sulfhídrico ni indol. (Tabla 13-3).

3.11 Pruebas bioquímicas para la identificación de los bacilos Gram negativos de las aguas termales del Balneario El Cachaco.

Para la identificación de los bacilos Gram negativos se realizaron las pruebas bioquímicas que se indican en la tabla 14-3.

Tabla 14-3: Pruebas bioquímicas de identificación de los bacilos Gram negativos de las aguas termales del Balneario El Cachaco.

N°	PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN																
	Morfología y tinción Gram	Catalasa	Oxidasa	O F	Agar Sangre		Crecimiento en agares			Medio Kligler			Medio SIM		Medio Úrea	Medio citrato	
					Crecimiento	Hemólisis	E.M.B.	MacConkey	<i>Salmonella-Shigella</i>	Glucosa Lactosa	G a s	H 2 S	Movilidad	I n o l			H 2 S
1-7	Bacilos Gram (-)	+	+	I	Cremoso opaco >1mm	γ	Colonias incoloras	Colonias incoloras	Colonias incoloras	Glucosa	-	-	-	+	-	-	+
2-11	Bacilos Gram (-)	+	+	O	Cremoso opaco >1mm	β	Amontonado colonias incoloras	Amontonado colonias incoloras	Colonias incoloras	Glucosa	-	-	-	-	-	+	+
3-38	Bacilos Gram (-)	+	+	O	Cremoso opaco >1mm	β	Colonias incoloras	Colonias incoloras	Amontonado colonias incoloras	Glucosa	-	-	-	-	-	+	+
3-49	Bacilos Gram (-)	+	+	O	Cremoso opaco >1mm	β	Amontonado colonias incoloras	Colonias incoloras	Amontonado colonias incoloras	Glucosa	-	-	-	-	-	+	+

OF=Oxidación-Fermentación, I=inerte, O=oxidativo.

Realizado por: CORTES Sandra, 2016

Luego de haber aislado 25 clones bacterianos se detectó que 4 de ellos eran bacilos Gram negativos los cuales contenían la enzima catalasa que descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular; la prueba de la oxidasa también fue positiva para todos los clones bacterianos ya que contenían enzimas oxidasas

La prueba de la oxidación fermentación nos dio a conocer que únicamente el clon bacteriano número 1-7 no metabolizó el azúcar ni por vía oxidativa ni fermentativa, el resto de clones bacterianos oxidaron el carbohidrato. Luego de la siembra de los clones bacterianos en el agar sangre crecieron colonias cremosas opacas de tamaño mayor a 1mm de diámetro, además el clon bacteriano número 1-7 no presentó hemólisis mientras que los demás clones mostraron beta hemólisis.

En el agar eosina azul de metileno se produjo un crecimiento de todos los clones bacterianos los cuales no fermentaron la lactosa, esto se evidenció debido a que sus colonias eran incoloras, de igual manera en el agar MacConkey crecieron todos los clones bacterianos los cuales no fermentaron la lactosa y originaron colonias incoloras además el medio de cultivo tomó un color ámbar, por tanto podrían tratarse de microorganismos del género *Pseudomonas*. En el agar *Salmonella-Shigella* todos los clones bacterianos crecieron y originaron colonias incoloras lo cual fue un indicativo de que no ocurrió la fermentación de la lactosa. (Laboratorios Britania S.A., 2010) (Becton Dickinson, 2013) (Laboratorios Britania S.A., 2015)

El medio Kligler nos permitió confirmar que todos los aislados bacterianos fermentaron la glucosa pero no la lactosa, además los clones bacterianos no produjeron gas ni ácido sulfhídrico; en relación al medio citrato todas las bacterias dieron un resultado positivo lo cual indicó que estos clones utilizaron el citrato como única fuente de carbono y como fuente de nitrógeno compuestos amoniacales.

La prueba de la úrea fue positiva para todos los aislados bacterianos excepto para el clon número 1-7, podemos decir entonces que este último no tuvo la capacidad de desdoblar la úrea; el medio de cultivo Sim nos permitió conocer que ningún microorganismo presentó movilidad es decir crecimiento fuera de la línea de inoculación y que ningún aislado bacteriano produjo ácido sulfhídrico.

En relación al indol el clon bacteriano número 1-7 es el único que presentó un resultado que se podría considerar como positivo, ya que el anillo que se formó en la superficie del medio SIM no fue exactamente de color rojo sino naranja lo cual indicaría la presencia de escatol que es un derivado del indol. (Universidad Técnica Federico Santa María, 2011) (Álvarez, 1995, p. 127)

3.12 Identificación de los clones bacterianos aislados de las muestras de agua termal del Balneario El Cachaco.

Los clones bacterianos aislados de las diferentes placas 3M Petrifilm y de los agares eosina azul de metileno y agar manitol salado fueron identificados a través de las características macroscópicas, microscópicas y de las pruebas bioquímicas dando los resultados que se muestran en la tabla 15-3.

Tabla 15-3: Identificación de las colonias aisladas de las aguas termales del Balneario El Cachaco.

Origen del clon bacteriano		Identificación de los microorganismos		Porcentaje de coincidencia de la identificación	Cantidad del microorganismo identificado	Porcentaje total del microorganismo encontrado en las aguas termales
Número	Color de la colonia repicada en el agar Mueller Hinton	Género	Especie			
1-4	Blanco cremoso	<i>Micrococcus</i>	<i>luteus</i>	70%	5	20%
2-5	Blanco cremoso	<i>Micrococcus</i>	<i>luteus</i>	70%		
3-11	Blanco cremoso	<i>Micrococcus</i>	<i>luteus</i>	70%		
4-2	Mostaza	<i>Micrococcus</i>	<i>luteus</i>	80%		
4-11	Creoso amarillento	<i>Micrococcus</i>	<i>luteus</i>	70%		
1-18	Blanco cremoso	<i>Staphylococcus</i>	<i>epidermidis</i>	80%		
2-2	Creoso amarillento	<i>Staphylococcus</i>	<i>epidermidis</i>	90%		
3-1	Blanco cremoso algo amarillento	<i>Staphylococcus</i>	<i>epidermidis</i>	70%		
3-7	Blanco cremoso	<i>Staphylococcus</i>	<i>epidermidis</i>	60%		

4-7	Mostaza	<i>Staphylococcus</i>	<i>epidermidis</i>	70%	7	28%
I-25	Blanco algo amarillento	<i>Staphylococcus</i>	<i>epidermidis</i>	70%		
I-60	Blanco	<i>Staphylococcus</i>	<i>epidermidis</i>	90%		
2-6	Cremoso amarillento	<i>Streptococcus</i>	<i>viridans</i>	70%	5	20%
2-12	Blanco cremoso	<i>Streptococcus</i>	<i>viridans</i>	80%		
3-17	Blanco cremoso	<i>Streptococcus</i>	<i>viridans</i>	80%		
3-62	Blanco cremoso algo amarillento	<i>Streptococcus</i>	<i>viridans</i>	80%		
I-46	Blanco amarillento	<i>Streptococcus</i>	<i>viridans</i>	100%		
I-29	Blanco cremoso	<i>Streptococcus</i>	<i>agalactiae</i>	80%	2	8%
I-39	Blanco algo amarillento	<i>Streptococcus</i>	<i>agalactiae</i>	90%		
I-42	Blanco cremoso algo amarillento	<i>Staphylococcus</i>	<i>saprophyticus</i>	90%	1	4%
6-42	Blanco cremoso algo amarillento	<i>Corynebacterium</i>	<i>spp.</i>	100%	1	4%
1-7	Blanco cremoso	<i>Campylobacter</i>	<i>spp.</i>	90%	1	4%
2-11	Blanco cremoso algo amarillento	<i>Pseudomonas</i>	<i>spp.</i>	90%	3	12%
3-38	Blanco cremoso	<i>Pseudomonas</i>	<i>spp.</i>	90%		
3-49	Cremoso	<i>Pseudomonas</i>	<i>spp.</i>	90%		

Realizado por: CORTES Sandra, 2016

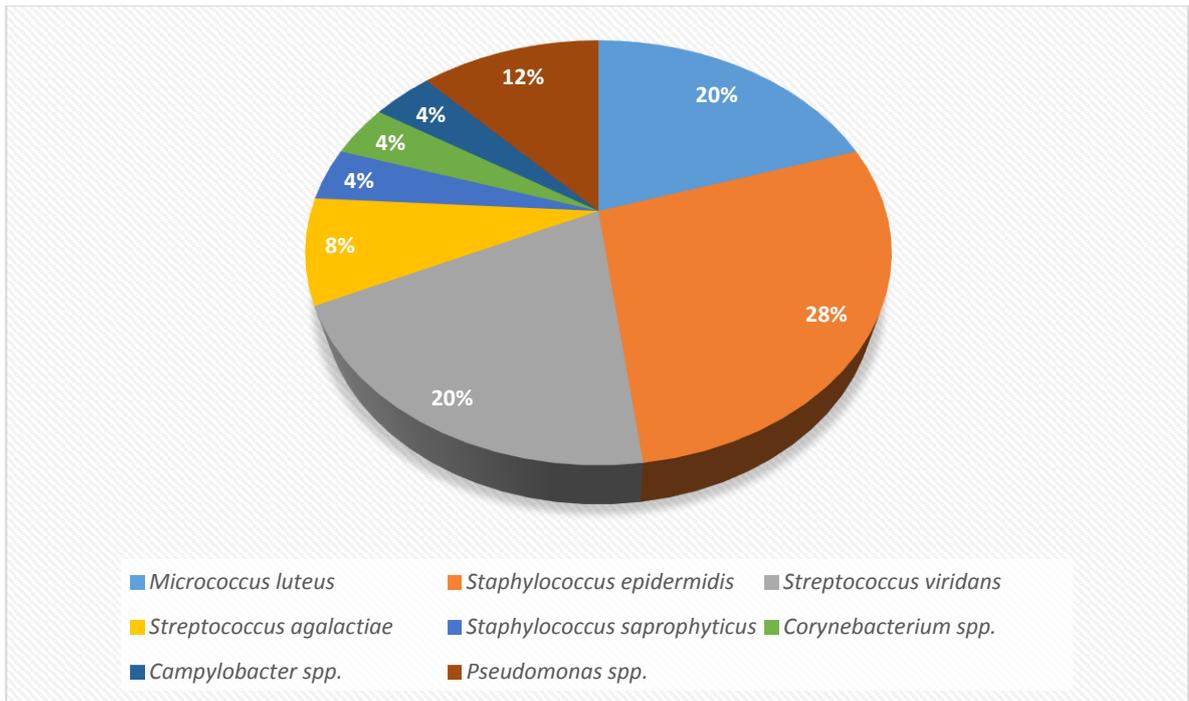


Gráfico 7-3: Porcentaje total de cada microorganismo encontrado en las aguas termales del Balneario El Cachaco.

Realizado por: CORTES Sandra, 2016

Los *Micrococcus luteus* fueron identificados con un porcentaje de coincidencia de entre el 70 y 80%, los *Staphylococcus epidermidis* fueron identificados con un nivel de coincidencia de entre el 60 y 90%, los *Streptococcus viridans* en su mayoría con un 80%, los *Streptococcus agalactiae* con un 80 y 90%, un clon bacteriano de *Staphylococcus saprophyticus* fue identificado con un 90% de similitud, un clon bacteriano de *Corynebacterium spp.* con un 100% de coincidencias, un clon bacteriano de *Campylobacter spp.* con un 90% de similitud y tres clones bacterianos de *Pseudomonas spp.* con un 90% de coincidencias.

Tomando en cuenta el porcentaje total de presencia cada microorganismo en las aguas termales del Balneario El Cachaco, se puede decir que predominaron los *Staphylococcus epidermidis* con un 28%, seguido de los *Micrococcus luteus* y *Streptococcus viridans* con un 20%, *Pseudomonas spp.* con un 12%, *Streptococcus agalactiae* con un 8% y el *Staphylococcus saprophyticus*, *Corynebacterium spp* y *Campylobacter spp* con un 4% cada uno. (Gráfico 7-3)

Por último a continuación se presenta una corta descripción de cada tipo de microorganismo identificado.

***Micrococcus luteus*:** Es una bacteria Gram positiva, dispuesta en cocos en forma de tétradas o racimos irregulares, aerobia estricta, sus colonias varían entre tonos de amarillo o blanco cremoso,

habita en varios ambientes como la piel, mucosas, orofaringe, tracto respiratorio superior, aire, suelo, polvo y agua, puede desarrollarse en ambientes con poca agua o con elevadas concentraciones de sal. (Pacheco, 2009)

Es un microorganismo halotolerante que crece en 5% de NaCl, susceptible a la bacitracina, ureasa y catalasa positivo, a menudo oxidasa positivo, no móvil, coagulasa negativo, no produce hemólisis, utiliza los carbohidratos por vía oxidativa, es un patógeno oportunista en personas inmunocomprometidas. (Aza y Cores, 2006) (UK STANDARDS FOR MICROBIOLOGY INVESTIGATIONS, 2014)

Staphylococcus epidermidis: Coco Gram positivo agrupado en racimos, aerobio o anaerobio facultativo, sus colonias son generalmente incoloras, se encuentra en la flora normal de la superficie corporal (piel) y en las mucosas de las personas y animales, es catalasa positivo, coagulasa negativo, sensible a la novobiocina, no produce hemólisis, no fermenta manitol, ureasa positiva, oxidasa negativa, puede usar la glucosa, sacarosa y lactosa para formar ácidos. (Chans, 2004)

Este microorganismo en presencia de lactosa produce gas, es un patógeno oportunista que causa infecciones en pacientes inmunocomprometidos o en personas que utilizan biomateriales como catéteres, prótesis óseas, tubos de diálisis, válvulas, lentes oculares, etc. (Ruiz, 2010, p.113)

Streptococcus viridans (Streptococcus orales): Coco Gram positivo en forma de parejas o cadenas, alfa o gama hemolítico, sus colonias son de tamaño inferior a 0,5mm, oxidasa y catalasa negativo, anaerobio facultativo, fermenta glucosa produciendo ácido láctico, no crece en caldo hipersalino con NaCl al 6.5%, resistente a la optoquina, puede o no crecer en manitol salado, resistente a la optoquina. (Montes y García, 2006, p.18) (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2006)

Esta bacteria se encuentra en la flora normal del tracto respiratorio y digestivo, en especial en la cavidad oral, faringe, colon y aparato genital femenino, produce endocarditis cuando se libera en la sangre luego de que un diente es extraído además puede ocasionar caries y abscesos dentales. (Winn, 2006, p.660)

Streptococcus del grupo B (Streptococcus agalactiae): Coco Gram positivo en forma de cadenas, aerobio y anaerobio facultativo, catalasa y oxidasa negativo, resistente a la bacitracina, en agar sangre las colonias grises son lisas, redondas y miden 2mm de diámetro, produce beta hemólisis aunque algunas cepas son gamma hemolíticas, se lo identifica tomando como base la hidrólisis de hipurato y la prueba de CAMP. (Brizuela, 2007, p.8)

Se caracteriza por poseer en su pared el grupo B de antígenos del sistema de Lancefield, su hábitat es la flora normal del tracto gastrointestinal, en ocasiones se encuentra en la vagina y el tracto urinario del que puede transmitirse al recién nacido en el momento del parto además puede

producir graves infecciones en el recién nacido como dificultad respiratoria, meningitis, sepsis, otitis y en adultos infecciones urinarias o vaginales. (De La Rosa y De Cueto, 2001) (Rodríguez, 2006) (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2006)

Staphylococcus saprophyticus: Coco Gram positivo en forma de racimos, anaerobio facultativo, catalasa y oxidasa positivo, coagulasa negativo, no formador de esporas, inmóvil, posee la enzima ureasa, resistente a la novobiocina, algunos microorganismos son manitol positivo, se encuentra ampliamente distribuido, puede ocasionar infecciones del tracto urinario en mujeres en edad joven y uretritis en varones. (Seija, 2006)

Corynebacterium spp.: Género de bacilos Gram positivos pleomórficos del filo *Actinobacteria* con forma de V o de letras chinas, aerobios o anaerobios facultativos, no móviles, catalasa positivos, no forman esporas, fermenta la glucosa, habitan en el suelo, agua, alimentos, la mayor parte se encuentra en la flora saprófita de la piel y en la mucosa tanto de humanos y animales, pueden ocasionar faringitis, endocarditis e infecciones. (Macedo y Vola, 2006) (BODE SCIENCE CENTER, 2016)

Corynebacterium diphtheriae o bacilo de Klebs-Löffler, es una especie patógena pues produce una toxina diftérica que se dispersa por la sangre causando los síntomas de la difteria, sus colonias pequeñas son de color blanco grisáceo brillante, de hemólisis variable, anaerobio facultativo, su hábitat es el humano en el cual coloniza el sistema respiratorio superior. (Rodríguez, 2013) (Microbiología Médica, 2014)

Otra especie patógena es *Corynebacterium xerosis* que forma parte de la flora normal de la nasofaringe, membranas mucosas y de la piel, produce endocarditis e infecciones en personas inmunocomprometidas entre estas septicemia, artritis séptica, osteomielitis vertebral, no genera hemólisis, ureasa negativa, no móvil y catalasa positiva. (Lortholary, 1993) (Vela, 2006)

Pseudomonas spp.: Son bacilos Gram negativos rectos o ligeramente curvados, aerobios estrictos, móviles pues presentan flagelos, no forman esporas, no fermentan la glucosa pero la usan por vía oxidativa, no forman gas, oxidasa y catalasa positivos, se encuentran en el suelo, aguas contaminadas, plantas y animales, ocasionan infecciones oportunistas, neumonías, queratitis, infección del tracto urinario, otitis, entre otras. (Torrice, 2010, pp. 323-325)

Entre las principales especie tenemos la *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* que producen un pigmento verde claro fluorescente y *Pseudomonas stutzeri* cuyo cultivo es rugoso y seco. (Torrice, 2010, pp. 323-325)

La *Pseudomonas aeruginosa* posee un olor y color determinado, se encuentra generalmente en el agua y en el suelo, contamina desinfectantes, material clínico etc; coloniza al ser humano al

ingresar a través de una herida o quemadura, en personas sanas no ocasiona ninguna patología. (Torrico, 2010, pp.325-326)

Campylobacter spp.: Proviene del griego *campylos* (curvo) y *baktron* (bacilo), son bacilos Gram negativos curvados o espiralados, móviles, microaerofílicos, poseen flagelos polares, crecen a 37°C excepto el *Campylobacter jejuni* que necesita una temperatura de 42°C para crecer, no forman esporas, presentan catalasa variable. (Winn, 2006, p.374) (Guías para la calidad del agua potable, 2006) (Elika, 2013) (Cervantes y Cravioto, 2007, pp. 31-35)

Este género se encuentra distribuido en la naturaleza en especial en el tracto digestivo de los mamíferos y aves, se transmite al ser humano mediante el contacto con animales tanto domésticos como silvestres, alimentos y agua contaminada. (Guías para la calidad del agua potable, 2006) (Elika, 2013) (Cervantes y Cravioto, 2007, pp. 31-35)

El *Campylobacter jejuni* es un microorganismo termófilo, de manera frecuente le ocasiona al ser humano infecciones, su reservorio es el intestino de los animales domésticos en especial las aves. (Chile. Boletín Instituto de Salud Pública, 2005-2013) (OMS, 2011)

3.13 Antibiograma de los cocos Gram positivos aislados de las aguas termales del Balneario El Cachaco.

Tabla 16-3: Antibiograma de los cocos Gram positivos aislados de las aguas termales del Balneario El Cachaco.

N° de colonia	IDENTIFICACIÓN	ANTIBIÓTICOS													
		AM 10ug	KF 30ug	E 15ug	F 300ug	CN 10ug	CRO 30ug	AMC 30ug	IPM 10ug	K 30ug	P 10U	TE 30ug	VA 30ug	OX 1ug	CIP 5ug
1-4	<i>Micrococcus luteus</i>	R	R	I	R	S	MS	I	S	S	R	S	R	R	S
1-18	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	R	R	S	R	S	MS	R	S	S	R	R	R	R	S
2-2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	R	S	R	S	S	S	S	S	I	R	S	R	R	S
2-5	<i>Micrococcus luteus</i>	R	R	R	R	S	MS	R	S	S	R	S	R	R	S
2-6	<i>Streptococcus viridans</i>	R	R	I	S	S	S	R	S	S	R	S	R	R	S
2-12	<i>Streptococcus viridans</i>	R	R	S	I	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S
3-1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	R	R	S	R	S	MS	R	S	S	R	S	I	R	S
3-7	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	R	R	S	R	S	MS	R	S	S	R	S	R	R	S
3-11	<i>Micrococcus luteus</i>	R	R	I	R	S	MS	S	S	S	R	S	I	R	S
3-17	<i>Streptococcus viridans</i>	R	R	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S
3-62	<i>Streptococcus viridans</i>	R	R	I	R	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S
4-11	<i>Micrococcus luteus</i>	R	R	S	R	S	MS	S	S	S	R	S	S	R	S

4-2	<i>Micrococcus luteus</i>	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
4-7	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
I-25	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	R	S
I-29	<i>Streptococcus agalactiae</i>	R	R	S	R	S	S	S	S	S	R	S	R	R	S
I-39	<i>Streptococcus agalactiae</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	R	S	R	S
I-42	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	S	S	I	S	S	S	S	S	R	S	R	S	R	S
I-46	<i>Streptococcus viridans</i>	R	S	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R	R	S
I-60	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

AM=ampicilina, KF= cefalotina, E=eritromicina, F=nitrofurantoina, CN=gentamicina, CRO=ceftriaxona, AMC=amoxicilina + ácido clavulánico, IPM= imipenem, K=kanamicina, P=penicilina,

TE=tetraciclina, Va=vancomicina, OX=oxacilina, CIP=ciprofloxacina, R=Resistente, S=Sensible, I=Intermedio, MS=Moderadamente sensible.

Realizado por: CORTES Sandra, 2016

La resistencia antibiótica representa un grave problema de salud en todo el mundo se define como la capacidad que tiene una bacteria de resistir al efecto del antibiótico, la cual es causada por la presencia de genes de resistencia que se pueden transmitir de una bacteria a otra mediante transferencia horizontal, intercambio de plásmidos, integrones o transposones. (Madigan, 2004, p.711) (Manual de actualización en resistencia bacteriana y normas CLSI M100-S20, 2010, p. 5)

La resistencia a un antibiótico se puede producir por varios mecanismos como la destrucción o inactivación del antibiótico a través de la producción de enzimas que lo hidrolizan, presencia de una capa lipídica externa en la membrana bacteriana que impide que el antibiótico penetre en la célula, modificación por mutación de las porinas de la membrana externa de la bacteria que dificulta el paso del antibiótico, alteración del sitio blanco de acción del fármaco entre otros. (Pérez, 1998, p.59) (Apaza y García, 2011) (Pérez y Robles, 2013, p.189) (Flórez, 2007, pp.6-8)

En la tabla 16-3 se muestran los resultados obtenidos del antibiograma de los cocos Gram positivos, observándose que todos los aislados bacterianos mostraron sensibilidad al aminoglucósido gentamicina, al antibiótico betalactámico imipenem y a la fluoroquinolona ciprofloxacina, cabe mencionar que la cefalosporina de tercera generación ceftriaxona también mostró rangos de sensibilidad y moderada sensibilidad en todos los aislados bacterianos.

Los resultados obtenidos muestran que además en el Balneario El Cachaco existieron niveles considerables de multiresistencia, 2 de los 20 aislados bacterianos (10%) poseían resistencia a 8 antibióticos diferentes, 1 de los 20 aislados bacterianos (5%) a 7 antibióticos distintos, 5 de los 20 aislados bacterianos (25%) fueron resistentes tanto a 6 como a 5 antibióticos diferentes, 1 de los 20 aislados bacterianos (5%) fue resistente a 4 antibióticos distintos, 2 de los 20 aislados bacterianos (10%) a 3 antibióticos, 1 de los 20 aislados bacterianos (5%) a 2 antibióticos y 3 de los 20 aislados bacterianos (15%) fueron resistentes a un solo antibiótico.

Los 5 clones bacterianos identificados como *Micrococcus luteus* mostraron resistencia a la nitrofurantoina pero en cambio fueron sensibles a los antibióticos gentamicina, kanamicina, imipenem, ciprofloxacina y tetraciclina; 4 de 5 clones bacterianos (80%) fueron resistentes a la ampicilina, cefalotina, penicilina, oxacilina, con respecto a la eritromicina 2 de 5 clones bacterianos (40%) fueron sensibles, 2 clones (40%) mostraron sensibilidad intermedia y un clon (20%) fue resistente; el antibiótico ceftriaxona fue moderadamente sensible para 4 clones bacterianos (80%) y 1 clon (20%) fue sensible; el antibiótico amoxicilina + ácido clavulánico fue sensible para 3 clones (60%), 1 clon (20%) mostró sensibilidad intermedia y 1 clon (20%) fue resistente; en cuanto a la vancomicina 2 clones (40%) fueron resistentes, 2 clones (40%) sensibles y 1 clon (20%) mostró sensibilidad intermedia.

Cedeño (2014) menciona que los *Micrococcus spp.* son sensibles a la mayoría de antibióticos entre estos la vancomicina, penicilina, gentamicina y clindamicina, lo cual coincide con lo reportado

para el Balneario El Cachaco únicamente en lo referente a la gentamicina, con respecto a la vancomicina el 40% de los clones bacterianos mostraron tanto sensibilidad como resistencia a este antibiótico mientras que el 80% de los clones fueron resistentes a la penicilina.

De los 7 clones bacterianos identificados como *Staphylococcus epidermidis* 5 (71.42%) mostraron sensibilidad a la eritromicina y tetraciclina y 2 (28.57%) resistencia a los mismos medicamentos; con respecto a la kanamicina 5 clones bacterianos (71.42%) fueron sensibles, 1 clon (14.28%) mostró sensibilidad intermedia y 1 clon (14.28%) resistencia; además 4 clones (57.14%) fueron sensibles a la cefalotina y a la amoxicilina + ácido clavulánico y 3 clones (42.85%) fueron resistentes a estos antibióticos, en lo que respecta a la ceftriaxona 4 clones (57.14%) fueron sensibles y 3 clones (42.85%) moderadamente sensibles. Los medicamentos ampicilina, nitrofurantoina y penicilina mostraron resistencia a 4 clones bacterianos (57.14%) y sensibilidad a 3 clones (42.85%); la vancomicina presentó tanto resistencia como sensibilidad a 3 clones (42.85%) y 1 clon (14.28%) mostró sensibilidad intermedia; por último el antibiótico oxacilina mostró resistencia a 5 clones bacterianos (71.42%) y sensibilidad a 2 clones (28.57%).

Chirinos-Saldaña et al. (2014, p.75) en su estudio del perfil microbiológico y sensibilidad a antibióticos de microorganismos aislados de infecciones conjuntivales, encontraron 9 cepas de *Staphylococcus epidermidis* de las cuales el 100% mostraron sensibilidad al antibiótico gentamicina, el 88.88% a la vancomicina y el 77.77% a la ciprofloxacina, resultados que coinciden con los reportados en este trabajo con excepción del medicamento vancomicina para el cual 3 clones (42.85%) mostraron tanto resistencia como sensibilidad y 1 clon (14.28%) sensibilidad intermedia.

Los 5 clones bacterianos identificados como *Streptococcus viridans* presentaron resistencia a la ampicilina, penicilina y oxacilina pero mostraron sensibilidad a la ceftriaxona, kanamicina y tetraciclina, en relación a la cefalotina 4 clones bacterianos (80%) fueron resistentes y 1 clon (20%) fue sensible; para la eritromicina 2 clones (40%) fueron sensibles, 2 clones (40%) de sensibilidad intermedia y 1 clon (20%) resistente; para la nitrofurantoina 3 clones (60%) fueron resistentes, 1 clon (20%) sensible y 1 clon (20%) de sensibilidad intermedia, con respecto a la amoxicilina + ácido clavulánico 4 clones bacterianos (80%) fueron sensibles y 1 clon (20%) resistente; en relación a la vancomicina 3 clones (60%) fueron sensibles y 2 clones (40%) resistentes.

González (2014) en su investigación del perfil antibiótico de estreptococos del grupo viridans aislados de la cavidad oral en individuos con uso prolongado de antibióticos menciona que de 136 cepas aisladas 109 correspondieron al *Streptococcus viridans*, de las cuales el 93.6% de cepas fueron sensibles a la amoxicilina + ácido clavulánico, ampicilina, ceftriaxona, eritromicina,

penicilina tetraciclina, vancomicina, 4.6% de cepas mostraron una resistencia intermedia y el 1.8% de cepas fueron resistentes a los mismos medicamentos.

El estudio realizado por González (2014) coincidió con el de las aguas termales del Balneario El Cachaco en cuanto a que la mayor cantidad de cepas fueron sensibles a la ceftriaxona, amoxicilina + ácido clavulánico, tetraciclina y vancomicina; los resultados en cuanto a la ampicilina y penicilina no coincidieron ya que en este trabajo los clones bacterianos fueron resistentes a estos antibióticos; en relación a la eritromicina las cepas resultaron ser en su mayoría sensibles e intermedias.

Los 2 clones bacterianos de *Streptococcus agalactiae* fueron sensibles a los antibióticos eritromicina, ceftriaxona y amoxicilina + ácido clavulánico así mismo fueron resistentes a la oxacilina; en relación a la kanamicina 1 clon bacteriano (50%) fue sensible y el otro clon (50%) mostró sensibilidad intermedia, para el resto de medicamentos se obtuvo un clon bacteriano resistente y uno sensible.

Alhambra et al. (1998-2002) en un estudio de la sensibilidad a 18 antibióticos clásicos y recientes de 145 cepas de *Streptococcus agalactiae* de sangre y orina, mencionaron que las cepas fueron sensibles a la penicilina G, ampicilina, cefotaxima, vancomicina, rifampicina, moxifloxacino, levofloxacino y linezolid; 32 cepas fueron resistentes o intermedias a la eritromicina y azitromicina y una gran cantidad fue resistente a la tetraciclina.

Belmar y colaboradores (2002, pp. 107-108) en el estudio de sensibilidad antimicrobiana de 183 cepas de *Streptococcus agalactiae* aisladas de la región vagino-perineal de embarazadas en el tercer semestre, indicaron que todas las cepas fueron sensibles a la penicilina, ampicilina, cefazolina y vancomicina, en relación a la eritromicina 177 cepas fueron sensibles, 2 cepas de sensibilidad intermedia y 2 resistentes.

Los resultados de los estudios de Alhambra y Belmar no concordarían del todo con el estudio realizado en el Balneario El Cachaco, pues de los dos clones bacterianos solo uno mostró sensibilidad a la penicilina, ampicilina y vancomicina, con respecto a la eritromicina los resultados no concuerdan con el estudio de Alhambra pues los clones bacterianos si mostraron sensibilidad y en relación a la tetraciclina uno de los dos clones fue resistente a este antibiótico.

Duque et al. (2011, pp.32-33) en una investigación del perfil de sensibilidad de *S. agalactiae* obtenido a partir de muestras de introito vaginal y región perineal de mujeres gestantes de Medellín (Colombia), encontraron que todas las 50 cepas fueron sensibles a la ampicilina y vancomicina, 25% de cepas fueron sensibles a la tetraciclina, 72% de cepas mostraron sensibilidad a la eritromicina y clindamicina y el 28% de cepas fueron resistentes a la clindamicina y eritromicina.

Luego de comparar los resultados de la investigación de Duque con los del Balneario El Cachaco no se concuerda con la total sensibilidad del *Streptococcus agalactiae* a los antibióticos ampicilina y vancomicina ya que solo 1 de los 2 clones bacterianos mostró sensibilidad, en cuanto a la tetraciclina 1 clon fue sensible y 1 clon resistente, en cambio en relación a la eritromicina los dos clones fueron sensibles.

El clon bacteriano identificado como *Staphylococcus saprophyticus* fue sensible a la ampicilina, cefalotina, nitrofurantoína, ceftriaxona, amoxicilina + ácido clavulánico, penicilina y vancomicina, además mostró sensibilidad intermedia para la eritromicina y fue resistente a la kanamicina, tetraciclina y oxacilina.

Molina y López (2016) indicaron que el *Staphylococcus saprophyticus* es sensible a los antibióticos usados generalmente para tratar infecciones urinarias no complicadas de tipo ambulatorio con excepción del ácido nalidíxico y la fosfomicina; se puede emplear betalactámicos como la amoxicilina + ácido clavulánico, cefuroxima axetilo, cefadroxilo, fluoroquinolonas o aminoglucósidos.

Lo mencionado por Molina y López coincide con el presente estudio en el que el *Staphylococcus saprophyticus* mostró sensibilidad a la amoxicilina + ácido clavulánico, a los betalactámicos penicilina, ampicilina, cefalotina, ceftriaxona, imipenem; la fluoroquinolona ciprofloxacina, el aminoglucósido gentamicina con excepción de la kanamicina que fue resistente.

Cabe mencionar que algunas de las cepas que mostraron un halo de inhibición del antibiótico clasificado como resistente mostraron crecimiento dentro del diámetro de dicho halo, como en el clon bacteriano número 1-4 con respecto a la nitrofurantoína, el clon bacteriano 2-5 en cuanto al antibiótico ampicilina, el clon bacteriano 3-1 en cuanto a la penicilina y vancomicina, el clon bacteriano 3-17 en relación a la cefalotina y el clon bacteriano I-29 en cuanto a la cefalotina y nitrofurantoína, demostrando así que hay una mezcla del microorganismo que tiene diferentes fenotipos de resistencia.

3.14 Antibiograma del bacilo Gram positivo aislado de las aguas termales del Balneario El Cachaco.

Tabla 17-3: Antibiograma del bacilo Gram positivo aislado de las aguas termales del Balneario El Cachaco.

N° de colonia	IDENTIFICACIÓN	ANTIBIÓTICOS													
		AM 10ug	KF 30ug	E 15ug	F 300ug	CN 10ug	CRO 30ug	AMC 30ug	IPM 10ug	K 30ug	P 10U	TE 30ug	VA 30ug	OX 1ug	CIP 5ug
6-42	<i>Corynebacterium spp.</i>	R	R	R	R	S	MS	R	S	S	R	I	R	R	S

AM=ampicilina, KF= cefalotina, E=eritromicina, F=nitrofurantoina, CN=gentamicina, CRO=ceftriaxona, AMC=amoxicilina + ácido clavulánico, IPM= imipenem, K=kanamicina, P=penicilina, TE=tetraciclina, Va=vancomicina, OX=oxacilina, CIP=ciprofloxacina, R=Resistente, S=Sensible, I=Intermedio, MS=Moderadamente sensible.

Realizado por: CORTES Sandra, 2016

Una de las causas primordiales de la aparición de la resistencia a los antibióticos ha sido el uso inapropiado de estos ya sea por una prescripción inadecuada de los mismos para tratar infecciones virales, prescripción frecuente de antibióticos de amplio espectro o el mal uso que el paciente le da a estos medicamentos durante su tratamiento en cuanto a la dosis o duración del mismo, lo que genera que algunos microorganismos sobrevivan y adquieran resistencia. (García, 2001, p.101) (Apaza y García, 2011).

En la tabla 17-3 se muestra los resultados del perfil de sensibilidad antibiótica del aislado bacteriano identificado como *Corynebacterium spp.*, el cual mostró sensibilidad a la gentamicina, imipenem, kanamicina y ciprofloxacina; moderada sensibilidad a la ceftriaxona, sensibilidad intermedia a la tetraciclina y resistencia a 8 antibióticos: ampicilina, cefalotina, eritromicina, nitrofurantoina, amoxicilina + ácido clavulánico, penicilina, vancomicina y oxacilina.

Fernández (2010, pp. 140-141) en su investigación acerca de la identificación y poder patógeno de microorganismos del género *Corynebacterium* aislados de muestras clínicas (2010), indicó que los 76 clones bacterianos de *C. amycolatum* mostraron sensibilidad a la vancomicina y linezolid, además de una resistencia > 81.6% de los clones a los antibióticos betalactámicos (penicilina, ampicilina, imipenem), una resistencia $\geq 75\%$ de los clones a los macrólidos (eritromicina, claritromicina y azitromicina) y clindamicina, la mitad de los clones fueron resistentes a la quinolona (ciprofloxacina con un 61.8%), tetraciclina en un 53% y cloranfenicol; <15% de clones mostraron resistencia a la gentamicina y rifampicina

De igual manera Fernández (2010, p.142) menciona que los aislados bacterianos de *C. coyleae* mostraron sensibilidad a la vancomicina, linezolid, gentamicina, rifampicina, tetraciclina, ampicilina e imipenem, pero fueron resistentes al ertapenem en un 14.8%, a la penicilina en un 22.2%, ciprofloxacina 29.6% y a la eritromicina en un 92.6%.

Los resultados anteriores en comparación a los obtenidos en las aguas termales del Balneario El Cachaco coinciden en cuanto a la especie *C. coyleae* en la sensibilidad a la gentamicina, imipenem y al predominio de clones resistentes al antibiótico eritromicina; en relación a la especie *C. amycolatum* concuerda la resistencia de la mayoría de clones a los antibióticos penicilina, ampicilina, eritromicina y en la sensibilidad intermedia a la tetraciclina; en cuanto a la vancomicina se obtuvo un resultado contrario a los estudios mencionados pues el microorganismo resultó resistente a este antibiótico.

Por último Fernández (2010, p.148) menciona que los 38 clones bacterianos de *Corynebacterium spp.* fueron sensibles a la vancomicina, linezolid y rifampicina, además de que fueron resistentes a la gentamicina en un 7.9%, a la tetraciclina en un 10.5%, a los betalactámicos (penicilina 21%, ampicilina 15.8%, imipenem 7.9%), a la quinolona (ciprofloxacina 26.3%), eritromicina con un 76.3%, y a la claritromicina con un 81.6%.

Los resultados obtenidos por Fernández en los clones bacterianos de *Corynebacterium spp.* coinciden con los resultados de este trabajo en cuanto al predominio de clones bacterianos resistentes a la eritromicina.

3.15 Antibiograma de los bacilos Gram negativos aislados de las aguas termales del Balneario El Cachaco.

Tabla 18-3: Antibiograma de los bacilos Gram negativos aislados de las aguas termales del Balneario El Cachaco.

N° de colonia	IDENTIFICACIÓN	ANTIBIÓTICOS												
		AM 10ug	PY 100ug	KF 30ug	S 300ug	F 300ug	CN 10ug	CRO 30ug	AMC 30ug	IPM 10ug	K 30ug	SXT 25ug	TE 30ug	CIP 5ug
1-7	<i>Campylobacter spp.</i>	R	R	R	R	R	R	MS	R	S	I	S	I	S
2-11	<i>Pseudomonas spp.</i>	R	R	R	S	R	S	R	R	S	S	R	I	S
3-38	<i>Pseudomonas spp.</i>	R	R	R	S	R	S	R	R	S	S	R	I	S
3-49	<i>Pseudomonas spp.</i>	R	R	R	S	R	S	R	R	S	S	R	I	S

AM=ampicilina, PY=carbenicilina, KF=cefalotina, S=estreptomicina, F=nitrofurantoina, CN=gentamicina, CRO=ceftriaxona, AMC=amoxicilina + ácido clavulánico, IPM= imipenem, K=kanamicina, SXT=trimetoprim-sulfametoxazol, TE=tetraciclina, CIP=ciprofloxacina, R=Resistente, S=Sensible, I=Intermedio, MS=Moderadamente sensible.

Realizado por: CORTES Sandra, 2016

La resistencia bacteriana a los antibióticos constituye una grave amenaza mundial pues al ser las bacterias multirresistentes impiden que la infección o enfermedad que ocasionaron responda adecuadamente al tratamiento, generando un padecimiento prolongado e incluso el riesgo de defunción, sumado a esto se incrementan los costos de atención sanitaria ya que debido a que la infección es resistente no es suficiente un tratamiento con medicamentos de primera línea sino que es necesario usar terapias costosas. (OMS, 2016).

En la tabla 18-3 se muestran los resultados obtenidos del antibiograma de los bacilos Gram negativos, en donde se puede observar que todos los clones bacterianos mostraron sensibilidad al imipenem y a la ciprofloxacina, además de una sensibilidad intermedia a la tetraciclina; por otro lado presentaron resistencia a la ampicilina, carbenicilina, cefalotina, nitrofurantoína y a la amoxicilina + ácido clavulánico. Los resultados obtenidos muestran además que los 4 aislados bacterianos identificados fueron resistentes al menos a 7 antibióticos diferentes

El clon bacteriano identificado como *Campylobacter spp.* presentó resistencia a la estreptomina y gentamicina, moderada sensibilidad a la ceftriaxona, sensibilidad intermedia a la kanamicina y sensibilidad al trimetoprim-sulfametoxazol; por otro lado los 3 clones bacterianos identificados como *Pseudomonas spp.* mostraron sensibilidad a la estreptomina, gentamicina y a la kanamicina además de que fueron resistentes a la ceftriaxona y al trimetoprim-sulfametoxazol.

Cabe mencionar que algunos de los clones bacterianos mostraron crecimiento en el halo de inhibición como en el caso del clon número 1-7 con los medicamentos ceftriaxona y amoxicilina + ácido clavulánico, los clones 2-11 y 3-49 con el antibiótico ceftriaxona, demostrando así que hay una mezcla del microorganismo que tiene diferentes fenotipos de resistencia.

Campos et al. (2003, pp. 217-218) en un estudio de la sensibilidad de *Campylobacter jejuni* a ocho antibióticos en cepas aisladas de muestras clínicas de niños, mencionaron que de las 80 cepas bacterianas un 4.9% fueron resistentes a la ampicilina, 61.7% mostraron resistencia a la tetraciclina y todas las cepas fueron sensibles a la amoxicilina + ácido clavulánico; estos resultados en comparación con los obtenidos en el Balneario El Cachaco concuerdan en cuanto a la existencia de clones bacterianos resistentes a la ampicilina no así en cuanto a la amoxicilina + ácido clavulánico ya que en este estudio el clon bacteriano fue resistente al antibiótico.

Por otro lado González y Alonso (2013, pp.93-94) en su estudio de la incidencia y sensibilidad de *Campylobacter jejuni* en pacientes pediátricos: implicación en bacteriemia (2010-2012) indicaron que de las 101 cepas estudiadas un 89% mostraron resistencia a la ciprofloxacina y un 12% sensibilidad al mismo antibiótico, además un 95% de cepas fueron sensibles a la eritromicina y un 5% fueron resistentes a la misma, estos resultados demuestran que si existen clones bacterianos sensibles a la ciprofloxacina lo cual coincide con los resultados obtenidos para el Balneario El Cachaco.

García y colaboradores (2009, p.512) en su estudio de la susceptibilidad antimicrobiana de *Campylobacter jejuni* aislado de coprocultivos en Santiago de Chile, indicaron que de las 73 cepas aisladas de coprocultivos, un 32.4% fueron resistentes a la ciprofloxacina y 1.4% mostraron resistencia a la ampicilina, además 5.4% de cepas mostraron resistencia intermedia a la ampicilina, estos resultados no concuerdan con los obtenidos para el Balneario El Cachaco en

donde el aislado bacteriano fue sensible a la ciprofloxacina pero por otro lado al igual que en este trabajo existieron clones bacterianos resistentes a la ampicilina.

Andueza y colaboradores (2015, p.160) en su estudio de la resistencia antimicrobiana en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de aguas termales de la provincia de Chimborazo, señalaron que las 15 cepas aisladas fueron sensibles a la vancomicina y resistentes a la ampicilina y ampicilina-sulbactam, además el 33.33% de las cepas mostraron multirresistencia a los antibióticos ampicilina, ampicilina-sulbactam, amikacina, ceftazidime, cefepime y ciprofloxacina.

El estudio anterior en relación al realizado en las aguas termales del Balneario El Cachaco coincide en cuanto a la resistencia a la ampicilina y en lo que se refiere a la ciprofloxacina pues al igual que en ese estudio existieron clones bacterianos que mostraron sensibilidad a este medicamento.

Luján et al. (2008, p.158) en una investigación acerca de la resistencia a los antibióticos en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* en un hospital universitario en Lima, mencionaron que de las 144 cepas aisladas de muestras de orina y de las vías respiratorias un 47% de cepas mostraron resistencia al imipenem, 51% sensibilidad y 2% sensibilidad intermedia, con respecto a la gentamicina un 55% de cepas mostraron resistencia, 36% sensibilidad y 9% sensibilidad intermedia, en relación a la ciprofloxacina el 57% de cepas mostraron resistencia, 33% sensibilidad y 10% sensibilidad intermedia.

Delgado y colaboradores (2007, pp.231-232) en su estudio de la sensibilidad y resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* a los antimicrobianos, indicaron que de las 3019 cepas aisladas 88.2% fueron sensibles al imipenem, 75.8% mostraron sensibilidad a la gentamicina y un 79.2% fueron sensibles a la ciprofloxacina.

Las dos investigaciones anteriores muestran que si hubo presencia de clones bacterianos de *Pseudomonas aeruginosa* sensibles al imipenem, gentamicina y ciprofloxacina al igual que en los resultados obtenidos para el Balneario El Cachaco.

De acuerdo al anual de actualización en resistencia bacteriana y normas CLSI M100-S20 (2010, p.33) de Bogotá, la *Pseudomonas aeruginosa* muestra resistencia a las penicilinas, cefalosporinas de primera y segunda generación y trimetoprim sulfametoxazol, además menciona que puede presentar multirresistencia a varios antibióticos por lo cual para tratar las infecciones causadas por este microorganismo se debe usar más de un medicamento; los resultados de esta investigación concuerdan con los obtenidos para el Balneario El Cachaco en cuanto a la resistencia a la ampicilina, a la cefalosporina de primera generación (cefalotina) y al trimetoprim sulfametoxazol.

CONCLUSIONES

- Las aguas del Balneario El Cachaco presentaron una temperatura promedio alrededor de 25°C con una temperatura ambiente promedio de 17°C, siendo la temperatura del agua superior con 8°C a la temperatura ambiente lo cual la hace termal, mientras que de acuerdo a la temperatura podrían clasificarse como hipotermales, el valor promedio de pH fue de 6,8 lo cual indicó que el agua termal era neutra.
- En todos los sitios muestreados del Balneario El Cachaco hubo presencia de aerobios mesófilos los cuales pueden haber provenido del ambiente y de los usuarios del agua termal, sin embargo los promedios del recuento del primer y segundo muestreo no superaron las 100 UFC/mL por lo cual se puede decir que estas bacterias no representaron un riesgo sanitario y mostró que el manantial tiene una protección aceptable de cualquier tipo de contaminación externa.
- En ninguna muestra de agua termal se encontró colonias de *Escherichia coli* lo cual coincidió con las normas de agua potable de Guatemala, México, Colombia y con el Real Decreto 742/2013 de los criterios técnicos sanitarios de la calidad del agua y aire de las piscinas de España, por otro lado se detectaron coliformes totales en cantidades inferiores a 9UFC/mL en tres de los cinco puntos muestreados que podrían provenir del suelo o de la vegetación y como no hubo presencia de *Escherichia coli* no constituyen un riesgo a la salud de los bañistas, además hubo sospecha de la presencia de *Pseudomonas*.
- El promedio de *Staphylococcus aureus* encontrado en las aguas termales fue de 1 UFC/mL, esta bacteria pudo provenir del aire o de los usuarios del agua termal y como no se encontraba en grandes cantidades no representó un riesgo sanitario para los bañistas.
- La cantidad total de levaduras que se detectó en las muestras de agua termal fue de 18 UFC/mL y 4 UFC/mL de mohos que pudieron provenir del suelo, restos vegetales o de los bañistas, estos resultados incumplen con la norma colombiana NTC 813 de agua potable y podrían estar generando una decadencia de la calidad sanitaria del lugar.
- En el recuento de colonias crecidas en el agar manitol salado se encontró que un 36.54% de ellas fermentaron el manitol y el 63.45% no fermentaron el manitol, de las colonias crecidas

en el agar eosina azul de metileno un 29.46% fermentaron la lactosa y un 70.53% no lo hicieron.

- De los 146 clones bacterianos que se aislaron de acuerdo a la tinción Gram predominaron los microorganismos Gram positivos con un 82.18% los cuales son más resistentes al calor y en relación a la morfología celular el 87.66% correspondieron a los cocos, para la identificación bacteriana se escogieron 25 aislados bacterianos, de los cuales 20 fueron cocos Gram positivos, 1 bacilo Gram positivo y 4 bacilos Gram negativos, se tomó en cuenta las características macroscópicas, microscópicas y los resultados de cada prueba bioquímica realizada.
- Luego de haber realizado las pruebas de identificación respectivas para los cocos Gram positivos, se determinó que 5 clones bacterianos (20%) correspondían al *Micrococcus luteus*, 7 clones (28%) al *Staphylococcus epidermidis*, 5 clones (20%) al *Streptococcus viridans*, 2 clones (8%) al *Streptococcus agalactiae* y 1 clon (4%) al *Staphylococcus saprophyticus*, por otro lado se identificó 1 bacilo Gram positivo (4%) como *Corynebacterium spp.*; de los bacilos Gram negativos, 1 (4%) correspondió al *Campylobacter spp.* y 3 (12%) a las *Pseudomonas spp.* todos estos géneros también han sido reportados en varios estudios microbiológicos de manantiales mineromedicinales con excepción de los géneros *Streptococcus* y *Campylobacter*.
- En cuanto al antibiograma todos los cocos Gram positivos fueron sensibles a la gentamicina, imipenem y ciprofloxacina, además existieron niveles considerables de multirresistencia: 2 de los 20 aislados bacterianos (10%) poseían resistencia a 8 antibióticos diferentes, 1 de los 20 aislados bacterianos (5%) a 7 antibióticos distintos, 5 de los 20 aislados bacterianos (25%) fueron resistentes tanto a 6 como a 5 antibióticos diferentes, 1 de los 20 aislados bacterianos (5%) fue resistente a 4 antibióticos distintos, 2 de los 20 aislados bacterianos (10%) a 3 antibióticos, 1 de los 20 aislados bacterianos (5%) a 2 antibióticos y 3 de los 20 aislados bacterianos (15%) fueron resistentes a un solo antibiótico.
- El bacilo Gram positivo perteneciente al género *Corynebacterium* mostró sensibilidad a la gentamicina, imipenem, kanamicina y ciprofloxacina; moderada sensibilidad a la ceftriaxona, sensibilidad intermedia a la tetraciclina y resistencia a 8 antibióticos: ampicilina, cefalotina, eritromicina, nitrofurantoina, amoxicilina + ácido clavulánico, penicilina, vancomicina y oxacilina.

- En cuanto al antibiograma de los bacilos Gram negativos, todos los clones bacterianos fueron sensibles al imipenem y a la ciprofloxacina, además mostraron una sensibilidad intermedia a la tetraciclina; por otro lado presentaron resistencia a la ampicilina, carbenicilina, cefalotina, nitrofurantoína y a la amoxicilina + ácido clavulánico; cabe mencionar que los 4 aislados bacterianos identificados fueron resistentes al menos a 7 antibióticos diferentes.
- Las propiedades fisicoquímicas del agua termal y su calidad microbiológica son propias de cada una de las aguas mineromedicinales, las cuales pueden variar debido a factores externos por lo cual estos cambios deben detectarse a tiempo para así estudiarlos, conocer sus causas y ejecutar acciones correctivas.

RECOMENDACIONES

1. Las autoridades competentes deben mejorar la infraestructura turística del Balneario El Cachaco para de esta manera disminuir los riesgos de contaminación del agua termal en especial en lo que respecta a las piscinas y puntos de surgencia del agua.
2. El agua termal que llena las dos piscinas del Balneario debe ser cambiada con más frecuencia para disminuir riesgos en la salud de los usuarios.
3. Antes de ingresar a las piscinas de agua termal los usuarios deben cumplir con ciertas normas como ducharse, utilizar gorro, zapatillas y terno de baño.
4. Se deben realizar estudios microbiológicos frecuentes en el Balneario El Cachaco a fin de garantizar su calidad sanitaria e identificar algún otro microorganismo presente en el agua termal que quizá pueda tener un uso biotecnológico.
5. En el Ecuador se debería instituir una legislación de las aguas termales en donde se establezcan los requisitos técnicos sanitarios que deben cumplir para su funcionamiento.
6. Capacitar al encargado del Balneario para que tome las precauciones adecuadas en el momento de realizar la limpieza de las piscinas para así disminuir la contaminación del agua termal y además se debe llevar registros de control de esta actividad.

BIBLIOGRAFÍA

3M. *Placa Petrifilm para Recuento E. coli y Coliformes* [en línea]. Lima-Perú: 2006a.

[Consulta: 06 agosto 2016].

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwiXq__1w5TOAhVLox4KHT3WDKAQFggqMAE&url=https%3A%2F%2Fsystem.netsuite.com%2Fcore%2Fmedia%2Fmedia.nl%3Fid%3D4019%26c%3D3339985%26h%3D213791686acc9e9f7d61%26_xt%3D.pdf&usg=AFQjCNFu366dOuQaEwy2IV-tY_FXCmU3mw&sig2=3ejuBIrRc4ErnSjH8V2LcA

3M. *Placa Petrifilm para Recuento de Hongos y Levaduras* [en línea]. Lima-Perú: 2006b

[Consulta: 06 agosto 2016].

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=3&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwiJmJ62xZTOAhWJ9x4KHZcbC_sQFggrMAI&url=https%3A%2F%2Fsystem.netsuite.com%2Fcore%2Fmedia%2Fmedia.nl%3Fid%3D4026%26c%3D3339985%26h%3Df98a73a78d447df92fce%26_xt%3D.pdf&usg=AFQjCNFnNbWYneOTOB9tJLmXMf5JEcASQ&sig2=U5FW46oV20iqAfLhf1u8sw

3M ESPAÑA S.A. *Análisis de Microorganismos Indicadores* [en línea]. 2016.

[Consulta: 06 agosto 2016].

http://solutions.productos3m.es/wps/portal/3M/es_ES/FoodSafetyEU/FoodSafety/ProductInformation/ProductCatalogue/?PC_Z7_RJH9U5230ODK40IMRSPA7P2O65000000_nid=2BJ86690LFbe8SD7TQV1GLgl

3M ESPAÑA S.A. *Consistencia y productividad maximizadas* [en línea]. Madrid: 2010.

[Consulta: 06 agosto 2016].

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=10&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwiojKW_787PAhWK7SYKHVhnAJ8QFghRMak&url=http%3A%2F%2Fwww.sefiltra.com%2Fpdf%2F3MPetrifil_Lector.pdf&usg=AFQjCNHxwySAAtQ89PaK5qtP60UjakOvftg&sig2=XLQvQ5h4vTws1nB1PFcB9Q

3M ESPAÑA S.A. *Placas Petrifilm y Lector de Placas Petrifilm* [en línea]. Madrid: 2013.

[Consulta: 06 agosto 2016].

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=6&ved=0ahUKEwjT_vvAwcDPAhWGKh4KHZLkD9UQFgg_MAU&url=http%3A%2F%2Fjornades.uab.cat%2Fworkshopmrama%2Fsites%2Fjornades.uab.cat.workshopmrama%2Ffiles%2FPetrifilm.pdf&usg=AFQjCNFeEj4KQLAgpurG5e7pXm-ASiBPSg&sig2=o4ChOkt3xmIr_FChte8adQ

3M ESPAÑA S.A. *Petrifilm Sistema de Recuento Staph Express* [en línea]. Madrid: 2002.

[Consulta: 06 agosto 2016].

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjyoMy3xJTOAhXBFx4KHe3QBh4QFgg1MAE&url=http%3A%2F%2Fmultimedia.3m.com%2Fmws%2Fmedia%2F374966O%2Fstx-interp-guide-spa.pdf&usg=AFQjCNHBIJho9-E2_aaNW-Hfl6dFKDFoBw&sig2=qJLsWwcLCXZnXrjTN4fGMg

3M MÉXICO. *Placas Petrifilm para el Recuento de Aerobios* [en línea]. 2004.

[Consulta: 06 agosto 2016].

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=4&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjWrOeZw5TOAhXDbR4KHRPIBDAQFggvMAM&url=http%3A%2F%2Fdepa.fquim.unam.mx%2Famyd%2Farchivero%2FPetrifilmAerobiccount_19100.pdf&usg=AFQjCNG3Ujrf0dt-Pwrereh5xaHXHQGBFA&sig2=e1c5rUdEv_B6cupzSvkRww

3M MÉXICO. *Placas Petrifilm para el Recuento de E. coli/ Coliformes* [en línea]. México: 2006.

[Consulta: 06 agosto 2016].

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=4&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwiXq__1w5TOAhVLox4KHT3WDKAQFgg2MAM&url=http%3A%2F%2Fmultimedia.3m.com%2Fmws%2Fmedia%2F444950O%2F3m-petrifilm-e-coli-coliform-count-plate-interpretation-guide-spanish.pdf&usg=AFQjCNGqSd8qTmEheHL4IJUaA_LMVrEpmw&sig2=awQqlrV6aig_zhYJ4vz8HA

ADMINISTRACIÓN DE ALIMENTOS Y MEDICAMENTOS (FDA). *Resistencia a los antibióticos* [en línea]. 2007.

[Consulta: 09 agosto 2016].

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0ahUKEwji-3x5e_NAhWLlx4KHSROCRAQFggeMAA&url=http%3A%2F%2Fwww.fda.gov%2Fdownload%2FForConsumers%2FByAudience%2FForWomen%2Fucm121906.pdf&usg=AFQjCNH9p55--CrU465Kp0sDxEC3fR5wAw&sig2=rXwPcrBHZLCeLVUGPf43KA&cad=rja

ALCÁNTARA, Gustavo. "La definición de salud de la Organización Mundial de la Salud y la interdisciplinariedad". *Sapiens*, 9, 1 (2008), (Venezuela) pp. 93-107.

ALHAMBRA, A; et al. Gómez. *Sensibilidad a dieciocho antibióticos clásicos y recientes de Streptococcus agalactiae aislados de sangre y orina* [en línea]. 1998-2002.

[Consulta: 26 agosto 2016].

<https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=10&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwia9Mex07LPAhWKGj4KHdW5CbMQFghaMAk&url=http%3A%2F%2Fseq.es%2Fseq%2F0214-3429%2F16%2Fsupp1%2F155.pdf&usg=AFQjCNG8PQwHT322v0ejPu8CcTt8-KfAQw&sig2=3ORooRmhLYq0WDq7E8N1VQ>

ALIAN. *Selección de colonias y morfología colonial de microorganismos* [blog]. 2012.

[Consulta: 14 agosto 2016].

http://projectomartin.blogspot.com/2012/12/practica-8_9.html

ÁLVAREZ, M.; et al. Boquet. *Manual de Técnicas en Microbiología Clínica*. España: 1995, pp. 1-305.

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS. *Microorganismos indicadores*.

Volumen 3. Córdoba: Metodología Analítica Oficial, 2014, pp. 1-136

ANDUEZA, Félix. *Microbiología del agua* [en línea]. Costa Rica: 2014.

[Consulta: 18 agosto 2016].

[https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwj2hfCfl_fPAhVLYsYKHeErDkgQFggeMAA&url=http%3A%2F%2Fwww.cff.org.br%2Fuserfiles%2Ffile%2FPasta%2520-%2520Costa%2520Rica%2F_XVI%2520Congreso%2520Farmac%25C3%25A9utico%2520Nacional%2520%2520\(PDF\)__%2FClase%25201%2520M%25C3%25A9todos%2520fisicoqu%25C3%25ADmicos%2520y%2520microbiol%25C3%25B3gicos%2520para%2520garantizar%2520la%2520calidad%2520del%2520agua.pdf&usg=AFQjCNGwMV2ptLPGzzjNO5ZMtfiv231K3A&sig2=f3mclC1cZB4YIB2_9eBQ_A](https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwj2hfCfl_fPAhVLYsYKHeErDkgQFggeMAA&url=http%3A%2F%2Fwww.cff.org.br%2Fuserfiles%2Ffile%2FPasta%2520-%2520Costa%2520Rica%2F_XVI%2520Congreso%2520Farmac%25C3%25A9utico%2520Nacional%2520%2520(PDF)__%2FClase%25201%2520M%25C3%25A9todos%2520fisicoqu%25C3%25ADmicos%2520y%2520microbiol%25C3%25B3gicos%2520para%2520garantizar%2520la%2520calidad%2520del%2520agua.pdf&usg=AFQjCNGwMV2ptLPGzzjNO5ZMtfiv231K3A&sig2=f3mclC1cZB4YIB2_9eBQ_A)

ANDUEZA F; et al. Albuja. "Resistencia antimicrobiana en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de aguas termales de la provincia de Chimborazo, Ecuador". *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 81, 2, (2015), (Ecuador), pp. 158-163. ISSN 1697-4298.

APAZA PINO, Rossana; & GARCÍA ORTÍZ, Marco. *Resistencia a los antibióticos* [en línea]. 2011.

[Consulta: 09 agosto 2016].

[https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=8&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjKyNyslpzOAhWCKB4KHU7SDFwQFghOMAc&url=http%3A%2F%2Fwww.aImageriatria.info%2Fpdf_files%2Fcol_09%2Falumnos_3%2FMarco%2520A.%2520Garcia-%2520Colombia-%2520RESISTENCIA_MICROBIANA-2%2520\(2\).pdf&usg=AFQjCNHrgWj-_4m10BXDp7Ra4gCBU-eZfg&sig2=bddZKVoAFig_8iyrsu5d7w](https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=8&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjKyNyslpzOAhWCKB4KHU7SDFwQFghOMAc&url=http%3A%2F%2Fwww.aImageriatria.info%2Fpdf_files%2Fcol_09%2Falumnos_3%2FMarco%2520A.%2520Garcia-%2520Colombia-%2520RESISTENCIA_MICROBIANA-2%2520(2).pdf&usg=AFQjCNHrgWj-_4m10BXDp7Ra4gCBU-eZfg&sig2=bddZKVoAFig_8iyrsu5d7w)

ARANGUREN, Yudy. *Taller de pruebas bioquímicas básicas utilizadas en el laboratorio de Microbiología* [en línea]. 2014.

[Consulta: 06 agosto 2016].

<http://es.slideshare.net/yudyaranguren/mmi-pruebas-bioquimicas-bsicas-utilizadas-en-el-laboratorio-de-microbiologa-yudy-aranguren-i-2011>

ARAVANLABS. *Placas de Petri Mannitol Salt Agar* [en línea]. 2015.

[Consulta: 06 agosto 2016].

<http://aravanlabs.com.uy/wp-content/uploads/2015/12/especificaciones-placas-de-petri-mannitol-salt-agar.pdf>

ARCOS, Mireya; et al. Ávila. "Indicadores microbiológicos de contaminación de las fuentes de agua", 3, 4 (2005), (Cundinamarca) pp. 69-79 ISSN: 1794-2470.

ATLAS DE BACTERIOLOGÍA. *Listeria monocytogenes* [en línea]. 2010.

[Consultado: 12 agosto 2016].

http://fundacionio.org/img/bacteriology/cont/Listeria_monocytogenes.html

AZA, Jaime; & CORES, Ana. *Cocos Gram positivos* [blog]. 2006.

[Consulta: 24 agosto 2016].

<https://microral.wikispaces.com/12.+Cocos+Gram+positivos+I>

BARBA, Luz. *Conceptos básicos de la contaminación del agua y parámetros de medición.* Santiago de Cali: 2002, pp. 1-48

BARRENECHEA, Ada. *Aspectos fisicoquímicos de la calidad del agua* [en línea]. 2005.

[Consulta: 18 agosto 2016].

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=4&cad=rja&uact=8&sqi=2&ved=0ahUKEwilkObBnf7OAhVE9R4KHeOsAkcQFgg0MAM&url=http%3A%2F%2Fwww.bvsde.paho.org%2Fbvsatr%2Ffulltext%2Ftratamiento%2FmanualI%2FtomoI%2Funo.pdf&usg=AFQjCNES5ZfN6y98WuqYIb88lhTZX9KcXg&sig2=l58xtz_2cUQawwdBIVEsew&bvm=bv.131783435,d.dmo

BARRENECHEA, Ada. *Tratamiento de agua para consumo humano. Plantas de filtración rápida* [en línea]. Tomo I. Lima: Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente (CEPIS/OPS), 2004.

[Consulta: 02 agosto 2016].

<https://es.scribd.com/doc/155823431/Manual-I-Teoria-1>

BARRIONUEVO, Yamill. La explotación de las aguas minero termales con fines turísticos (tesis). (Maestría). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Administrativas, Unidad de Post Grado. (Lima-Perú). 2004. p.1-141.

BECTON DICKINSON GMBH. *BD EMB Agar (Eosin Methylene Blue Agar), Modified* [en línea]. 2013a.

[Consulta: 06 agosto 2016].

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=10&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjY8Ji_uZTOAhWBVh4KHf_dC4sQFghGMAk&url=https%3A%2F%2Fwww.bd.com%2Fresource.aspx%253FIDX%253D8765&usg=AFQjCNHk6aLOCMWyvdmxtDBDODhOHS06Wg&sig2=npkd3brZuF3bD-tnMY-mLg

BECTON DICKINSON GMBH. *BD MacConkey II Agar* [en línea]. 2014.

[Consulta: 06 agosto 2016].

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=3&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwi59pLJt5TOAhWE0h4KHfmRB9cQFggvMAI&url=http%3A%2F%2Fwww.bd.com%2Fresource.aspx%253FIDX%253D8770&usg=AFQjCNGvdwrCA8QrR55-90D6LLzIg_6ZiQ&sig2=MifP9LmKMsQzHSIYn6iHBghhttp://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/maconkeyagar.htm

BECTON DICKINSON GMBH. *BD Mannitol Salt Agar* [en línea]. 2013b.

[Consulta: 06 agosto 2016].

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=5&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjL0Iu7_pPOAhVHlh4KHSlaAc8QFggyMAQ&url=https%3A%2F%2Fwww.bd.com%2Fresource.aspx%3FIDX%3D8771&usg=AFQjCNff9dOgRHAeqv1a5weUKWiQ9_5_w&sig2=bMaLWrb5u30gko0Uc5c4tA

BECTON DICKINSON GMBH. *BD Salmonella Shigella Agar* [en línea]. 2013c.

[Consulta: 06 agosto 2016].

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=3&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwiywa69kpTOAhWKsh4KHV_QCq0QFggmMAI&url=http%3A%2F%2Fwww.bd.com%2Fresource.aspx%3Fidx%3D8779&usg=AFQjCNHB-c78bX06ui9MBaINlrjx3NwOg&sig2=X-yhu0aTx2f5_0waZaj-Wghttp://britannialab.com.ar/esp/productos/b02/salmoshigagar.htm

BELMAR, Cristián; et al. Abarzúa. "Estudio de sensibilidad antimicrobiana de 183 cepas de *Streptococcus agalactiae* aisladas en región vagino-perineal de embarazadas en el tercer trimestre". *Revista Chilena de Obstetricia y Ginecología*, 67, 2, (2002), (Chile) pp. 106-109.

BERNAL, Maye; & GUZMAN, Miguel. "El antibiograma de discos. Normalización de la Técnica de Kirby-Bauer". *BIOMEDICA*, 4, 3, (1984), pp. 112-121.

BODE SCIENCE CENTER. *Corynebacterium spp. (bacterium)* [en línea]. 2016.

[Consulta: 24 agosto 2016].

<http://www.bode-science-center.com/center/relevant-pathogens-from-a-z/corynebacterium-spp.html>

BRIZUELA, Marcelo. "Estreptococo Agalactiae Grupo B (EGB). Patógeno emergente de infección grave en neonatos y niños". *Revista Bianálisis*, (2007) pp.8-10.

BURBANO, Napoleón; et al. Becerra. *Aguas termominerales en el Ecuador* [en línea] Ecuador: 2013.

[Consulta: 03 agosto 2016].

<https://issuu.com/inamhi/docs/termalismo>

BURBANO, Napoleón; et al. Becerra. *Introducción a la Hidrogeología del Ecuador*. 2ª ed. Ecuador: 2015, pp.1-121.

BUSTOS, Jaime; et al. Hamdan. "Staphylococcus aureus: la reemergencia de un patógeno en la comunidad". *Revista Biomed*, 17, 4 (2006), (México) pp. 287-305

CABRERA Cristina; et al. Gómez. "La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación", 38, 2, (2007), (Colombia), pp. 149-158.

CAIMANQUE, Soledad; & ESCUDERO, Eliana. *Factores que afectan a los microorganismos* [en línea]. 2012.

[Consulta: 18 agosto 2016].

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=6&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjzjI_ghoHPAhXLHB4KHav3BIUQFgg-MAU&url=http%3A%2F%2Fbiblioteca.duoc.cl%2Fbdigital%2FDocumentos_Digitales%2F600%2F610%2F39592.pdf&usg=AFQjCNEplhmMDR1PsU14ebhLWgvJyQxEa&sig2=a5dJ1MrDOQz5M8GPZynJYg

CALDARIA. *Historia del termalismo: El origen de termas y balnearios* [en línea]. 2016.

[Consulta: 28 agosto 2016].

<http://www.caldaria.es/historia-del-termalismo-el-origen-de-termas-y-balnearios/>

CALDAS, M. "Potencialidades de los atractivos turísticos de Calacalí". *Kalpana*, 11 (2014), (Ecuador), pp.16-31. ISSN: 1390-5775.

CAMACHO, A; et al. Giles. *Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos* [en línea]. México: 2009.

[Consulta: 05 agosto 2016].

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=3&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjfys-x5oXPAhWCJh4KHXhpDmkQFggwMAI&url=http%3A%2F%2Fdepa.fquim.unam.mx%2Famyd%2Farchivero%2FTecnicBasicas-Cuenta-mohos-levaduras_6530.pdf&usg=AFQjCNHfx8Sv8eAuUb5ww2bU4tzOq0Nbg&sig2=I8Ror0WYniV3pfO6zSTpjA

CAMPOS, J; et al. Alarcón. "Sensibilidad de *Campylobacter jejuni* a ocho antibióticos en cepas aisladas de muestras clínicas de niños". *Rev. Esp. Quimioterap.*, 16, 2 (2003), (Madrid) pp. 216-220.

CANO, FloridaIma. *Aspectos sobre la calidad microbiológica del agua para consumo humano* [en línea]. 2016.

[Consulta: 18 agosto 2016].

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=6&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwj5r_rNqoXPAhUHqR4KHZV5C58QFghBMAU&url=http%3A%2F%2Fwww.colmedegua.org%2Ffiles%2FCALIDAD%2520DE%2520AGUA.pdf&usg=AFQjCNEVleuoV5NUqZAtkydrwfv5h8EVAw&sig2=aX5m8MnJm71OZKMvF2oMVA

CARBAJAL AZCONA, Ángeles; & GONZÁLEZ FERNÁNDEZ, María. "Propiedades y funciones biológicas del agua". *Agua para la Salud. Pasado, presente y futuro*, (2012), (España), pp. 33-45.

CASADO, M^a Concepción; et al. Torrico. *Medios de cultivo en un laboratorio de microbiología*. 2012, pp.1-42.

CLAVELL, Luis; et al. Pedrique. *Selección de Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Microorganismos*. Venezuela: 2009.

[Consulta: 08 agosto 2016].

<http://www.ucv.ve/organizacion/facultades/facultad-de-farmacia/programas-academicos/pregrado/catedras/catedra-de-microbiologia/material-de-apoyo/seleccion-de-pruebas-bioquimicas.html>

CEDEÑO, Génesis. *Micrococcus* [en línea]. 2014.

[Consulta: 24 agosto 2016]

<http://es.slideshare.net/g3n3xiitap/micrococcus-39055987>

CERCENADO, Emilia; & SAAVEDRA, Jesús. *El antibiograma. Interpretación del antibiograma: conceptos generales (I)* [en línea]. Madrid-España: 2009.

[Consultado: 12 agosto 2016].

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

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *Identification of Other Streptococcus Species: Streptococcus General Methods* [en línea]. 2006.

[Consulta: 24 agosto 2016].

<http://www.cdc.gov/streplab/strep-doc/general-methods-section2.html>

CERVANTES GARCÍA, Estrella; & CRAVIOTO Q, Alejandro. "Campylobacter y enfermedades asociadas" *Medigraphic Artemiza* [en línea], 2007, 50 (1), pp. 31-35.

[Consulta: 24 agosto 2016].

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwi_4dKM85nPAhUJGh4KHVQvAbYQFggkMAE&url=http%3A%2F%2Fwww.medigraphic.com%2Fpdfs%2Ffacmed%2Fun-2007%2Fun071j.pdf&usg=AFQjCNFHboOHGPPmzF368wAtmQciK33pTA&sig2=DRyekULZLVSehyMOfR5eJw

CONCHA, Luis. *La química del Agua* [en línea]. Chile: 2008

[Consulta: 02 agosto 2016].

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=6&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjYnauGrIfOAhVMHh4KHb2CBxAQFgg9MAU&url=http%3A%2F%2Fwww.educarchile.cl%2FP0001%2FFile%2Fla_quimica_del_agua.pdf&usg=AFQjCNFAwAaDo6XBrbF0UySbDz2xft7wSw&sig2=0Qh3Wf7wIWZHTCRagWdNyQ&bvm=bv.127521224,d.dmo

CHANS, Gerardo. *Estafilococos* [en línea]. 2004.

[Consulta: 24 agosto 2016].

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwij5e3e2LzOAhXKOCYKHTO1BIsQFggkMAE&url=http%3A%2F%2Fwww.higiene.edu.uy%2Fcefa%2FLibro2002%2FCap%252017.pdf&usg=AFQjCNHbYTijEdqmRV_fhYrOodB3Sy-5_w&sig2=6oSqh2iZddnzFJ59pmLD7w

CHILE. BOLETIN INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA. *Vigilancia de laboratorio de Campylobacter spp.* [en línea]. Chile: 2005-2013.

[Consulta: 24 agosto 2016].

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=8&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwi_4dKM85nPAhUJGh4KHVQvAbYQFghIMAc&url=http%3A%2F%2Fwww.ispch.cl%2Fsites%2Fdefault%2Ffiles%2FBolet%25C3%25ADn%2520Campylobacter.pdf&usg=AFQjCNFpOFtv0M9PDi4A_z5aFsvFdOJ5AQ&sig2=E1lc5XKahgM4Hox_TX18TQ

CHIRINOS, Patricia; et al. Graue. "Perfil microbiológico y sensibilidad a antibióticos de microorganismos aislados de infecciones conjuntivales en el Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana". *Elsevier*, 88, 2, (2014), (México) pp. 73-77.

DE LA ROSA FRAILE, Manuel; & DE CUETO LÓPEZ, Marina. *Streptococcus agalactiae* [en línea]. 2001.

[Consulta: 24 agosto 2016].

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=5&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwiw7Mim35LPAhUHFR4KHV4UCg0QFgg_MAQ&url=https%3A%2F%2Fwww.seimc.org%2Fcontenidos%2Fccs%2Frevisionestematicas%2Fbacteriologia%2Fagalac.pdf&usq=AFQjCNH2HQvGXEGvqZQ0SXahKrzmpZSHLQ&sig2=7Hga2hFwmM-FdfoDysK4Vw

DE LA ROSA JORGE, M^a del Carmen; & MOSSO ROMEO, M^a Ángeles. "Diversidad microbiana de las aguas minerales termales" *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, (2000), (Madrid-España), pp.153-158.

DE LA ROSA JORGE, M^a Carmen; et al. Andueza. "Microbiología de las aguas mineromedicinales de los Balnearios de Jaraba". *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 70, (2004), (Madrid) pp. 521-542

DE LA ROSA, M^a del Carmen; et al. Mosso. "Microbiología del agua mineromedicinal del Balneario El Paraíso de Manzanera (Teruel) ". *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 67, (2001), (España) pp. 1-14

DE LA ROSA JORGE, M^a Carmen; et al. Pintado. "Microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario de Alicún de las Torres". *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 75, (2009), (Madrid) pp. 763-780.

DE LA ROSA JORGE, M^a Carmen; et al. Pintado. "Microbiología del agua mineral del Balneario Villa de Olmedo". *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 81, (2015), (España) pp. 54-63.

DE LA ROSA JORGE, M^a C; et al. Sánchez. "Microbiología del manantial mineromedicinal del Balneario Puente Viesgo". *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 73, (2007), (Madrid) pp. 251-265.

DELGADO, M; et al. García. "Sensibilidad y resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* a los antimicrobianos". *Rev. Esp. Quimioterap*, 20, 2 (2007), (España) pp. 230-233.

DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO. *Microbiología e Inmunología* [en línea]. 2010.

[Consulta: 06 agosto 2016].

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwi04rKiiJTOAhWKGB4KHXY6AaQQFggkMAE&url=http%3A%2F%2Fecaths1.s3.amazonaws.com%2Fcatmicromed%2FClase%25202%2520-%2520Seminaro.pdf&usg=AFQjCNGhUM95DQDrQRhxP3Beto-suGpdtA&sig2=D6-POkss22OI_5fYHMjivw

DÍAZ Gustavo. *Morfología y estructura bacteriana* [en línea]. 2009.

[Consulta: 07 agosto 2016].

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=4&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwi4kvyT8Y7OAhVFFx4KHXY3OAAAYQFggxMAM&url=https%3A%2F%2Fmicrobitos.files.wordpress.com%2F2010%2F06%2Fmorfologia-y-estructura-bacteriana.pdf&usg=AFQjCNHK8c5KUqwMfKgd2ph4bUZsPNH1Zg&sig2=4KNmLGS3hlkYNdq6_v0fWQ

DUQUE, Clara; et al. Gómez. "Perfil de sensibilidad de *S. agalactiae* obtenido a partir de muestras de introito vaginal y región perineal de mujeres gestantes de Medellín" *NOVA Publicación científica en ciencias Biomédicas*, 9, 15 (2011), (Colombia) pp. 31-34

ECUADOR. CONSTITUCIÓN DE LA REPÚBLICA 2008.

[Consulta: 28 agosto 2016].

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwi2uLWbtPjPAhUIMyYKHQRqBgcQFggeMAA&url=http%3A%2F%2Fwww.oas.org%2Fjuridico%2Fpdfs%2Fmesicic4_ecu_const.pdf&usg=AFQjCNGGGYSU6sA6whhCfI2LJEp2UPO1Zw&sig2=o1r0tFYNCCTVfPBODIkI6A

ECURED. *Aguas termales* [en línea]. 2000.

[Consulta: 03 agosto 2016].

https://www.ecured.cu/Aguas_termales

ELIKA. *Campylobacter* [en línea] 2013.

[Consulta: 24 agosto 2016].

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=4&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwi_4dKM85nPAhUJGh4KHVQvAbYQFggvMAM&url=http%3A%2F%2Fwww.elika.eus%2Fdatos%2Fpdfs_agrupados%2FDocumento83%2F2.Campylobacter.pdf&usg=AFQjCNEBG2vA6yVbQ7oiWNOIpEpQGEVtCw&sig2=QroNgrGuSm3LUy2vqkxKkw

ESPAÑA. INSTITUTO GEOLÓGICO Y MINERO. *Composición química de las aguas subterráneas naturales* [en línea]. España: 2002.

[Consulta: 18 agosto 2016].

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwji17jNIPfPAhXCTCYKHRPmDMsQFggeMAA&url=http%3A%2F%2Faguas.igme.es%2Ffigme%2Fpublica%2Flibro43%2Fpdf%2Flib43%2F1_1.pdf&usg=AFQjCNEs0oe49u9LhAv4ULrWi6FcJaNIcg&sig2=SgWuIiYuNS0J13ZaRI8JkQ

ESPAÑA. INSTITUTO GEOLÓGICO Y MINERO. *Infraestructura hidrotermal* [en línea].

España: 2002.

[Consulta: 02 agosto 2016].

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwivweOqgorOAhUJbR4KHRXJCvwQFgghMAE&url=http%3A%2F%2Faguas.igme.es%2Ffigme%2Fpublica%2Fpdfjor_aguas_mine%2F3_infraestructura.pdf&usg=AFQjCNE5vX-qgGmFOAsDk9T0bVWJa9waYA&sig2=flim-ge-WOH3vKvHRCB2OA

ESPAÑA. REAL DECRETO 742/2013, de 27 de septiembre: Criterios técnicos-sanitarios de la calidad del agua y del aire de las piscinas.

FAGUNDO CASTILLO, Juan; & GONZÁLEZ HERNÁNDEZ, Patricia. *Aguas naturales, minerales y mineromedicinales* [en línea]. 2004.

[Consulta: 02 agosto 2016].

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=8&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjA8vbH-onOAhVDkh4KHc7AB9sQFghPMAC&url=http%3A%2F%2Fwww.sld.cu%2Fsitios%2Fmednat%2Fdocs%2Faguas.pdf&usg=AFQjCNF_iQ_L14YgDObMw3AXOgshjISFBA&sig2=nef-5bHOM3LomrEXeEtGDw

FAGUNDO, J.R: et al. Cima. *Revisión bibliográfica sobre clasificación de las aguas minerales y mineromedicinales* [en línea] 2004.

[Consulta: 03 agosto 2016]

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwj1qWM0vPPAhVHySYKHfZtDLsQFggkMAE&url=http%3A%2F%2Fwww.sld.cu%2Fgalerias%2Fpdf%2Fsitios%2Frehabilitacion-bal%2Fclasificacion_aguas_minerales.pdf&usg=AFQjCNGVzPQnO9eK8BokbC_x2X9FsZGt9w&sig2=pB0lp0wNm4AsdenjUdDV6g

FÉLEZ SANTAFÉ, Marta. *El agua* [en línea]. 2009

[Consulta: 02 agosto 2016].

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=6&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwiT3OSc44nOAhVB9h4KHVdbCnYQFgg_MAU&url=https%3A%2F%2Fupcommons.upc.edu%2Fpdf%2Fbitstream%2F2099.1%2F6263%2F4%2F03_Mem%25C3%25B2ria.pdf&usg=AFQjCNG7s7wjQz4A6DeMdn5ZOSvvtNKVIA&sig2=rnWFXmxoCci9o9Latepszw

FERNÁNDEZ. *Procedimiento Técnica de Coagulasa en tubo* [en línea]. 1993.

[Consulta: 08 agosto 2016].

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=3&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjk9ZzZrZXOAhWDWh4KHU2LAyQQFggqMAI&url=http%3A%2F%2Fwww.ispch.cl%2Fsites%2Fdefault%2Ffiles%2Fdocumento_tecnico%2F2011%2F08%2FPRT-712.02-026%2520V%25205%2520tecnica%2520coagulasa%2520en%2520tubo.pdf&usg=AFQjCNFBg5ts-TTF90XJGc5I76-RrTfjOg&sig2=Lzkus3sHYx8wbRmD7alFPQ

FERNÁNDEZ, Ana; et al. García. "Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología" *Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, (2010), (España), pp. 1-28. ISSN 978-84-614-7932-0

FERNÁNDEZ, María Isabel. Identificación y poder patógeno de microorganismos del género *Corynebacterium* aislados de muestras clínicas (Tesis) (Doctoral). Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Medicina, Departamento de Microbiología I. (Madrid). 2010. pp.1-341

FLÓREZ GARCÍA, Ana Belén. Perfil de susceptibilidad/resistencia a antibióticos en bacterias del ácido láctico y bifidobacterias. Caracterización molecular de genes de resistencia. (Tesis). (Doctoral). Universidad de Oviedo, Departamento de Biología Funcional, Área de Microbiología. 2007, pp. 1-159.

GAITAN Isabel. *Pruebas bioquímicas para identificación de enterobacterias* [en línea]. 2011. [Consulta: 08 agosto 2016].

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwiQ2aj-mJ_OAhVGJh4KHYYhcBXgQFggeMAA&url=http%3A%2F%2Fecaths1.s3.amazonaws.com%2Fmicro%2F340329342.11-pruebas-bioquic3admicas-de-identificac3b3n-de-enterobacterias.pdf&usg=AFQjCNE1qwor7v8Z5CgKUFAjgq-Xivr2w&sig2=68NpYDCI3V2-zpHB1g8zZg

GARCÍA Fernando. "Resistencia bacteriana a antibióticos". *Acta Médica Costarricense*, 43, 003, (2001), (Costa Rica) pp. 101-102. ISSN 0001-6002.

GARCÍA, Patricia; et al Valenzuela. "Susceptibilidad antimicrobiana de *Campylobacter jejuni* aislado de coprocultivos en Santiago de Chile". *Scielo Chile* [en línea], 2009, (Chile) 26 (6), pp. 511-514.

[Consulta: 26 agosto 2016]. ISSN 0716-1018

http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182009000700004

GEOSALUD. *Las Aguas Termales y sus Propiedades Curativas* [en línea]. 2014.

[Consulta: 03 agosto 2016].

http://www.geosalud.com/aguas_termales/aguas_termales.htm

GIRÓN, Walther. *Antimicrobianos* [en línea]. 2008.

[Consulta: 09 agosto 2016].

<https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwie7cq89jPAhUDJh4KHdjeCDoQFggeMAA&url=http%3A%2F%2Fwww.bvs.hn%2FRFCM%2Fpdf%2F2008%2Fpdf%2FRFCMV015-2-2008-11.pdf&usg=AFQjCNH1CcrwnfXu51b-kPL5NvqAvcFA&sig2=ymR3k74PG0odfUQnY-9GPA>

GOOGLE MAPS. *Calacalí* [en línea]. 2016.

[Consulta: 03 agosto 2016].

<https://www.google.com/maps/place/Calacal%C3%AD,+Ecuador/@-0.0991078,-78.5309856,11z/data=!4m2!1m15!4m14!1m6!1m2!1s0x91d587872f1e4759:0xe808569e86a65dbd!2sCalacal%C3%AD,+Ecuador!2m2!1d-78.5163894!2d0.0011424!1m6!1m2!1s0x91d59a4002427c9f:0x44b991e158ef5572!2sQuito,+Ecuador!2m2!1d-78.4678382!2d-0.1806532!3m4!1s0x91d587872f1e4759:0xe808569e86a65dbd!8m2!3d0.0011424!4d-78.5163894>

GONZÁLEZ, Andrea. *Perfil antibiótico de Estreptococos del Grupo viridans aislados de cavidad oral en individuos con uso prolongado de antibióticos* [en línea]. 2014.

[Consulta: 24 agosto 2016].

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=10&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwj70_nf0rLPAhUJcD4KHaAwCL4QFghbMAk&url=http%3A%2F%2F repositor y.javeriana.edu.co%2Fbitstream%2F10554%2F15482%2F1%2FGonzalezAndrea2014.pdf&usq =AFQjCNHTwTGypGThOexICwN1uxj_qFd6MA&sig2=5LVfnG6iKoyo7yVIQfj1Jg

GONZÁLEZ ABAD, María José; & ALONSO SANZ, Mercedes. "Incidencia y sensibilidad de *Campylobacter jejuni* en pacientes pediátricos: implicación en bacteriemia." *Rev. Esp. Quimioter.*, 26, 2 (2013), (Madrid) pp. 92-96.

GRANADOS PÉREZ, Raquel; & VILLAVERDE PERIS, M^a Carmen. *Microbiología. Bacteriología. Medios de cultivo y pruebas bioquímicas. Micología general. Parasitología general.* Tomo II. 2^a ed. Australia: Thomson Paraninfo, 2003, pp. 6-151

GUATEMALA. BACTERIAS DE INTERÉS CLÍNICO. *Staphylococcus spp.* [blog].

Guatemala: 2014.

[Consulta: 14 agosto 2016].

<https://compendiomicrobiologia.wordpress.com/2014/03/09/staphylococcus-spp/>

GUEVARA, Antonio. *Métodos de análisis para la evaluación de la calidad del agua.* Lima: 1996, pp. 1-47

GUÍAS PARA LA CALIDAD DEL AGUA POTABLE. *Recomendaciones.* 3ª ed. Volumen 1. Organización Mundial de la Salud, 2006, pp. 1-393

HUACAN, Ángel. *Procedimiento de muestreo, conservación y transporte de aguas* [en línea]. Perú: 2014.

[Consultado: 14 agosto 2016].

[https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=3&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjo_oT1u_bPAhXB3SYKHdC-](https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=3&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjo_oT1u_bPAhXB3SYKHdC-ALQQFggrMAI&url=http%3A%2F%2Fintranet.redesur.com.pe%2Fsig-redesur%2FRegistros%2520SIG%2F04%2520Operacion%2F10%2520Solicitudes%2520de%2520Trabajo%2F2016%2FS.E.%2520SOCABAYA%2FSOC%252016-14%2FPROCEDIMIENTO%2520DE%2520MUESTREO%2520CONSERVACION%2520Y%2520TRANSPORTE%2520DE%2520AGUAS.pdf&usg=AFQjCNFupdipOvCmjedcO5MDEa8MFSrA4A&sig2=9hvyL9IzwxX9AyP3cgS48Q)

[ALQQFggrMAI&url=http%3A%2F%2Fintranet.redesur.com.pe%2Fsig-](http://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=3&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjo_oT1u_bPAhXB3SYKHdC-ALQQFggrMAI&url=http%3A%2F%2Fintranet.redesur.com.pe%2Fsig-redesur%2FRegistros%2520SIG%2F04%2520Operacion%2F10%2520Solicitudes%2520de%2520Trabajo%2F2016%2FS.E.%2520SOCABAYA%2FSOC%252016-14%2FPROCEDIMIENTO%2520DE%2520MUESTREO%2520CONSERVACION%2520Y%2520TRANSPORTE%2520DE%2520AGUAS.pdf&usg=AFQjCNFupdipOvCmjedcO5MDEa8MFSrA4A&sig2=9hvyL9IzwxX9AyP3cgS48Q)

[redesur%2FRegistros%2520SIG%2F04%2520Operacion%2F10%2520Solicitudes%2520de%2520Trabajo%2F2016%2FS.E.%2520SOCABAYA%2FSOC%252016-](http://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=3&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjo_oT1u_bPAhXB3SYKHdC-ALQQFggrMAI&url=http%3A%2F%2Fintranet.redesur.com.pe%2Fsig-redesur%2FRegistros%2520SIG%2F04%2520Operacion%2F10%2520Solicitudes%2520de%2520Trabajo%2F2016%2FS.E.%2520SOCABAYA%2FSOC%252016-14%2FPROCEDIMIENTO%2520DE%2520MUESTREO%2520CONSERVACION%2520Y%2520TRANSPORTE%2520DE%2520AGUAS.pdf&usg=AFQjCNFupdipOvCmjedcO5MDEa8MFSrA4A&sig2=9hvyL9IzwxX9AyP3cgS48Q)

[14%2FPROCEDIMIENTO%2520DE%2520MUESTREO%2520CONSERVACION%2520Y%](http://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=3&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjo_oT1u_bPAhXB3SYKHdC-ALQQFggrMAI&url=http%3A%2F%2Fintranet.redesur.com.pe%2Fsig-redesur%2FRegistros%2520SIG%2F04%2520Operacion%2F10%2520Solicitudes%2520de%2520Trabajo%2F2016%2FS.E.%2520SOCABAYA%2FSOC%252016-14%2FPROCEDIMIENTO%2520DE%2520MUESTREO%2520CONSERVACION%2520Y%2520TRANSPORTE%2520DE%2520AGUAS.pdf&usg=AFQjCNFupdipOvCmjedcO5MDEa8MFSrA4A&sig2=9hvyL9IzwxX9AyP3cgS48Q)

[2520TRANSPORTE%2520DE%2520AGUAS.pdf&usg=AFQjCNFupdipOvCmjedcO5MDEa8](http://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=3&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjo_oT1u_bPAhXB3SYKHdC-ALQQFggrMAI&url=http%3A%2F%2Fintranet.redesur.com.pe%2Fsig-redesur%2FRegistros%2520SIG%2F04%2520Operacion%2F10%2520Solicitudes%2520de%2520Trabajo%2F2016%2FS.E.%2520SOCABAYA%2FSOC%252016-14%2FPROCEDIMIENTO%2520DE%2520MUESTREO%2520CONSERVACION%2520Y%2520TRANSPORTE%2520DE%2520AGUAS.pdf&usg=AFQjCNFupdipOvCmjedcO5MDEa8MFSrA4A&sig2=9hvyL9IzwxX9AyP3cgS48Q)

[MFSrA4A&sig2=9hvyL9IzwxX9AyP3cgS48Q](http://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=3&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjo_oT1u_bPAhXB3SYKHdC-ALQQFggrMAI&url=http%3A%2F%2Fintranet.redesur.com.pe%2Fsig-redesur%2FRegistros%2520SIG%2F04%2520Operacion%2F10%2520Solicitudes%2520de%2520Trabajo%2F2016%2FS.E.%2520SOCABAYA%2FSOC%252016-14%2FPROCEDIMIENTO%2520DE%2520MUESTREO%2520CONSERVACION%2520Y%2520TRANSPORTE%2520DE%2520AGUAS.pdf&usg=AFQjCNFupdipOvCmjedcO5MDEa8MFSrA4A&sig2=9hvyL9IzwxX9AyP3cgS48Q)

INTRODUCCIÓN AL TERMALISMO. *Historia* [en línea]. 2006.

[Consulta: 28 agosto 2016].

[https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwia_sycktbOAhXImh4KHSuTDmQQFggeMAA&url=http%3A%2F%2Fwww.sld.](https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwia_sycktbOAhXImh4KHSuTDmQQFggeMAA&url=http%3A%2F%2Fwww.sld.cu%2Fgalerias%2Fpdf%2Fsitios%2Frehabilitacion-ba1%2Fintroduccion_al_termalismo.pdf&usg=AFQjCNGI9nQCb-zTYrCtqMapDkBaQVA5nA&sig2=MZt4hYngOTL80ADeEmyAjQ)

[cu%2Fgalerias%2Fpdf%2Fsitios%2Frehabilitacion-](https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwia_sycktbOAhXImh4KHSuTDmQQFggeMAA&url=http%3A%2F%2Fwww.sld.cu%2Fgalerias%2Fpdf%2Fsitios%2Frehabilitacion-ba1%2Fintroduccion_al_termalismo.pdf&usg=AFQjCNGI9nQCb-zTYrCtqMapDkBaQVA5nA&sig2=MZt4hYngOTL80ADeEmyAjQ)

[ba1%2Fintroduccion_al_termalismo.pdf&usg=AFQjCNGI9nQCb-](https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwia_sycktbOAhXImh4KHSuTDmQQFggeMAA&url=http%3A%2F%2Fwww.sld.cu%2Fgalerias%2Fpdf%2Fsitios%2Frehabilitacion-ba1%2Fintroduccion_al_termalismo.pdf&usg=AFQjCNGI9nQCb-zTYrCtqMapDkBaQVA5nA&sig2=MZt4hYngOTL80ADeEmyAjQ)

[zTYrCtqMapDkBaQVA5nA&sig2=MZt4hYngOTL80ADeEmyAjQ](https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwia_sycktbOAhXImh4KHSuTDmQQFggeMAA&url=http%3A%2F%2Fwww.sld.cu%2Fgalerias%2Fpdf%2Fsitios%2Frehabilitacion-ba1%2Fintroduccion_al_termalismo.pdf&usg=AFQjCNGI9nQCb-zTYrCtqMapDkBaQVA5nA&sig2=MZt4hYngOTL80ADeEmyAjQ)

LABORATORIOS W. BRIZUELA S.A. *Bacitracina* [en línea]. Argentina: 2015a.

[Consultado: 12 agosto 2016].

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=5&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjRoK6H_53OAhUDqR4KHc6ODAAQFgg5MAQ&url=http%3A%2F%2Fwww.brizuela-lab.com.ar%2Fmanuales%2FBacitracina.pdf&usg=AFQjCNFYSR5BTvZbWk2A3Q7KjcGzGO0FRw&sig2=0YgFIId9WaJ118widXCE4FQ

LABORATORIOS BRITANIA S.A. *Discos de Optoquina* [en línea]. Argentina: 2012.

[Consultado: 12 agosto 2016].

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=8&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwiH6JPMjJ3OAhVFVh4KHe57ApEQFgg7MAc&url=http%3A%2F%2Fwww.britanialab.com%2Fproductos%2F194_hoja_tecnica_es.pdf&usg=AFQjCNGrsO5CnUGCrvem80v-1mDXmMvAkQ&sig2=cVslVcrSAeu2xWbVUb5IPQ

LABORATORIOS BRITANIA S.A. *E.M.B. Agar (con Eosina y Azul de Metileno)* [en línea]. Argentina: 2010a.

[Consulta: 06 agosto 2016].

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwi04rKiiJTOAhWKGB4KHxY6AaQQFggeMAA&url=http%3A%2F%2Fwww.britanialab.com%2Fproductos%2F229_hoja_tecnica_es.pdf&usg=AFQjCNF2GV4wexRu8VYw3bnAgjnF9DismQ&sig2=-pJoZII2pBb54eVyO71g-Q

LABORATORIOS BRITANIA S.A. *MacConkey Agar* [en línea]. Argentina: 2015b.

[Consulta: 06 agosto 2016].

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=5&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwiK1t_njpTOAhXLqB4KHV3xC1IQFgg4MAQ&url=http%3A%2F%2Fwww.britanialab.com%2Fproductos%2FB23114%2520REV%252001-MAC%2520CONKEY%2520AGAR.pdf&usg=AFQjCNF2DfGIvp199k9X3khIF3cujWNkJw&sig2=c_vTyowC7E18FkWtsSxZlw

LABORATORIOS BRITANIA S.A. *Manitol Salado Agar* [en línea]. Argentina: 2015c.

[Consulta: 06 agosto 2016].

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjL0Iu7_pPOAhVHlh4KHSlaAc8QFggiMAE&url=http%3A%2F%2Fwww.britanialab.com%2Fproductos%2FB02118%2520REV%252001-MANITOL%2520SALADO%2520AGAR.pdf&usg=AFQjCNHIX38PWQarKO1HBQe8bVGA PFjIYA&sig2=p_vq97BG6Tk6lY3GWZ21EA

LABORATORIOS BRITANIA S.A. *Salmonella Shigella Agar* [en línea]. Argentina: 2015d.

[Consulta: 06 agosto 2016].

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwiywa69kpTOAhWKsh4KHV_QCq0QFggkMAE&url=http%3A%2F%2Fwww.britanialab.com%2Fproductos%2FB02138%2520REV%252001-SALMONELLA%2520SHIGELLA%2520AGAR.pdf&usg=AFQjCNHsjPGDenW31cMCZiLEQEkwtiYsQ&sig2=cWzficbOHeuJX9zOyQcSoQ

LABORATORIOS BRITANIA S.A. *Sangre Agar Base* [en línea]. Argentina: 2015e.

[Consulta: 06 agosto 2016].

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&cad=rja&uact=8&sqi=2&ved=0ahUKEwihhMH_-pPOAhVBXB4KHT68C3YQFggiMAE&url=http%3A%2F%2Fwww.britanialab.com%2Fproductos%2FHT%2520B04149%2520REV%252001-SANGRE%2520AGAR%2520BASE.pdf&usg=AFQjCNFIRMS6axGNu_FbcVGgbU4utOQkMg&sig2=fUT1pOit8gSm28XyhyICyQ&bvm=bv.128153897,d.dmo

LABORATORIOS BRITANIA S.A. *Triptéina Soya Caldo* [en línea]. Argentina: 2011.

[Consulta: 06 agosto 2016].

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEWjcqKj1xpXOAhUGpB4KHTpKBqkQFggeMAA&url=http%3A%2F%2Fwww.britanialab.com%2Fproductos%2F613_inserto_es.pdf&usg=AFQjCNEKvtomsl-45edbhi0kWCexSdin_w&sig2=wHiLitwH1M9bk8iFoHa7rg

LABORATORIOS BRITANIA S.A. *Ureasa Medio para la Prueba* [en línea]. Argentina: 2010b.

[Consulta: 08 agosto 2016].

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=4&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjW8c6kn5XOAhVDJx4KHTcjCkwQFggxMAM&url=http%3A%2F%2Fwww.britanialab.com%2Fproductos%2F604_hoja_tecnica_es.pdf&usg=AFQjCNGMIaz8_ZUFKGAeYMYJtJ6dzxzk7Q&sig2=8K075_ol3isjouX9gACrUg

LABORATORIOS BRITANIA S.A. *Violeta Rojo y Bilis Agar* [en línea]. Argentina: 2015f.

[Consulta: 06 agosto 2016].

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjnreWF-s7PAhVDQyYKHbbMChUQFggeMAA&url=http%3A%2F%2Fwww.britanialab.com%2Fproductos%2FB02143%2520REV%252001-VIOLETA%2520ROJO%2520Y%2520BILIS%2520AGAR.pdf&usg=AFQjCNH8GLC77wz-gOBFCBgPmlaeNQ3DCQ&sig2=kyhG1mNdY1_My48gcP0x_g

LAGARTO, Alicia; & BERNAL, Ingrid. "Utilización terapéutica de las aguas y fangos mineromedicinales". *Scielo* [en línea], 2002, (Cuba) 36 (1).

[Consulta: 28 agosto 2016]. ISSN 1561-2988

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152002000100009

LÓPEZ, Juan; et al. Fornés. *Las aguas subterráneas. Un recurso natural del subsuelo.* 4ª ed. Madrid-España: Fundación Marcelino Botín, 2009. pp. 1-97

LÓPEZ TÉVEZ, Leonor; & TORRES, Carola. *Medios de cultivo* [en línea]. 2006.

[Consulta: 06 agosto 2016].

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=6&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwj89utj4_OAhWPMx4KHbCjDV0QFgg7MAU&url=http%3A%2F%2Fwww.biologia.edu.ar%2Fmicrogeneral%2Ftp4.pdf&usg=AFQjCNE81u0eBn5Zy8ljy8d9OuANGwLw4A&sig2=gXWPS5m2LynSBsavfVUYAg

LORTHOLARY, O; et al. HOI. *Mediastinitis Due to Multiply Resistant Corynebacterium xerosis* [en línea]. 1993.

[Consulta: 24 agosto 2016].

<http://cid.oxfordjournals.org/content/16/1/172.extract#>

LUJÁN, Daniel; et al. Ibarra. "Resistencia a los antibióticos en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* en un hospital universitario en Lima, Perú". *Revista Biomédica* [en línea], 2008, (Perú) 19 (3), pp. 156-160.

[Consulta: 26 agosto 2016].

<https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=9&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwik8quyv7XPAhXBNj4KHS1CBnUQFghXMAg&url=http%3A%2F%2Fwww.revbiomed.uady.mx%2Fpdf%2Frb081935.pdf&usg=AFQjCNF2qrVCZqxhk6nrkMXtsac9s33naA&sig2=iW4qfZfrY1DldRJBqx-mMg>

MACEDO, M; & VOLA. M. *Principales grupos de bacilos Gram positivos aerobios* [en línea]. 2006.

[Consulta: 24 agosto 2016].

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=9&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwi9vrLezJXPAhXD4KHc_tBH0QFghPMAg&url=http%3A%2F%2Fwww.higiene.edu.uy%2Fcefa%2F2008%2Fgrampositivosaerobios.pdf&usg=AFQjCNEqLI8dvtmf5He438IDfGkX8Gq5NQ&sig2=WEtcjOcqE6-bMiQQVocHuw

MADIGAN, Michael; et al. Martinko. *Brock Biología de los microorganismos*. 10ª ed. Madrid: Pearson, 2004, pp. 1-1011.

MANUAL DE ACTUALIZACIÓN EN RESISTENCIA BACTERIANA Y NORMAS CLSI M100-S20. Grupo para el control de la resistencia Bacteriana. Bogotá, 2010, pp. 1-75.

MARÍN, Rafael. *Características físicas, químicas y biológicas de las aguas* [en línea]. Córdoba: 2008.

[Consulta: 03 agosto 2016]

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=3&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwj35PLT5PPPAhWJ6SYKHRK8BgMQFggtMAI&url=http%3A%2F%2Fapi.ei.es%2Fapi_v1_dev.php%2Ffedora%2Fasset%2Feoi%3A48101%2Fcomponente48099.pdf&usg=AFQjCNEPWndcMzLyWCXa92YhtWfu1JoApg&sig2=wjEqjTqkpAyFXIueqAbmFQ

MARTIN, Ruth. *Pruebas bioquímicas* [en línea]. 2011.

[Consulta: 08 agosto 2016].

http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/U3c_PruebasBioquimicas_17461.PDF

MARTÍNEZ, Laura. *Tipos de diseños de investigación* [en línea]. 2011.

[Consultado: 12 agosto 2016].

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwiJ18vCtfbPAhVI4iYKHSQiD8IQFggeMAA&url=http%3A%2F%2Fwww.cochrane.es%2Ffiles%2FTipoDisenInvestigacion_0.pdf&usg=AFQjCNEN61fxswWkluSi69LpknV1vCVeDQ&sig2=JIw3j-q8nU9RyCdmsr-WA

MEADE Maura. *Los Microbios: cómo funcionan y cómo lo cambian los antibióticos* [en línea]. 2001.

[Consulta: 09 agosto 2016].

http://www.actionbioscience.org/esp/evolucion/meade_callahan.html

MÉNDEZ, Avilio. *Aguas termales* [blog]. 2010.

[Consulta: 03 agosto 2016].

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

MERINO, Luis. *Estructura Bacteriana* [en línea]. 2010.

[Consulta: 07 agosto 2016].

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=10&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwi4kvyT8Y7OAhVFFx4KH3Y3OAAAYQFghXMAk&url=http%3A%2F%2Fecaths1.s3.amazonaws.com%2Fcatmicromed%2FAPUNTE%2520Morfologia%2520bacteriana.pdf&usg=AFQjCNFUncs7_QjASDDVHqhaPzQw-cn_EQ&sig2=tfRXb7WcWMqL9yq6B_Xqtg

MICROBIOLOGÍA MÉDICA. *Corynebacterium diphtheriae* [blog]. 2014.

[Consulta: 24 agosto 2016].

<https://carlaurrutia87.wordpress.com/2014/03/24/corynebacterium-diphtheriae/>

MERINO, Luis; & LOSCH, Liliana. *Familia Enterobacteriaceae* [en línea]. 2010.

[Consulta: 18 agosto 2016].

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjU1dWBp4rPAhUEXR4KHZCSDtsQFggnMAE&url=http%3A%2F%2Fecaths1.s3.amazonaws.com%2Fcatmicromed%2FAPUNTE%2520Enterobacterias.pdf&usg=AFQjCNH77I4DYN_U2eQyHp9pzydUHYrnwA&sig2=_xae1WcD41LOOxLwX3241w

MERINO PÉREZ, Jesús; & NORIEGA BORGE, María José. *El agua: volúmenes y composición de los líquidos corporales* [en línea]. Cantabria: 2011

[Consulta: 02 agosto 2016].

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=3&cad=rja&uact=8&sqi=2&ved=0ahUKEwjg6jSgojOAhVE2B4KHX7UDioQFggqMAI&url=http%3A%2F%2Focw.unican.es%2Fciencias-de-la-salud%2Ffisiologia-general%2Fmateriales-de-clase-1%2Fbloque-ii%2FTema%2520I-Bloque%2520II-El%2520Agua%2520Volúmenes%2520y%2520Composicion.pdf&usg=AFQjCNE7zNTS11yj-XTSDp_5fKk3rknYeg&sig2=zQCcMOrrWyA5tNUQXg8EBg&bvm=bv.127521224,d.dmo

MONTAÑO, N; et al. Sandoval. *Los microorganismos* [en línea]. 2010.

[Consulta: 05 agosto 2016].

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=5&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwil_OPL2Y3OAhXMKh4KHd7wC1gQFgg1MAQ&url=http%3A%2F%2Fwww.elementos.buap.mx%2Fnum77%2Fpdf%2F15.pdf&usg=AFQjCNGOmcPt5MZQOvMqEomv9HP3VPaRHQ&sig2=Sq_N7-RaBZAzfH_d9VGP3w&bvm=bv.127984354,d.dmo

MOLINA, Araceli; & LÓPEZ, José. *Infección urinaria recidivante por Staphylococcus saprophyticus con fenotipo mucoso. Caso 576* [en línea]. 2016.

[Consulta: 26 agosto 2016].

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=8&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwix5rvG_rLPAhVEaz4KHX9PA7wQFghdMAc&url=http%3A%2F%2Fwww.wider.es%2Fcasosclinicos%2Findex.php%2Finfeccion-urinaria-recidivante-por-staphylococcus-saprophyticus-con-fenotipo-mucoso-caso-576%2F%3Fprint%3Dpdf&usg=AFQjCNEWQQnjs7cZFp0ZKqNjEBQvqj-I-Q&sig2=AxF3C7ksTOK-xkBdRxf06Q

MOLINA, J; et al. Uribarren. *Generalidades de Bacterias* [en línea]. 2015.

[Consulta: 05 agosto 2016].

<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/generalidades.html>

MONTES, Milagrosa; & GARCÍA ARENZANA, José María. "Género *Streptococcus*: una revisión práctica para el laboratorio de microbiología". 24 Suplemento 3 (2006), (España) pp. 14-20.

MORALES, Mónica; et al. Pérez. *Microbiología del agua, impacto en la salud e importancia en el ambiente*. IRAPUATO: 2010. pp. 1-31.

MOSSO ROMEO, M^a Ángeles; & DE LA ROSA JORGE, M^a Carmen. "Microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario de Baños de la Concepción". *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 77, (2011), (España) pp. 57-73

MOSSO ROMEO, M^a Ángeles; et al. Sánchez. "Microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario Cervantes". *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 72, (2006), (España) pp. 285-304.

MOSSO ROMEO, M^a A.; et al. Sánchez. "Microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario de Valdelateja". *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 74, (2008), (Madrid) pp.505-521.

NTE INEN 1882:2012: *Agua. Definiciones en donde se dan los conceptos de agua mineral natural y de agua subterránea.*

NTE INEN 2226: 2000: *Agua. Calidad del agua. Muestreo. Diseño de los programas de muestreo.*

NTE INEN 2169:1998: *Agua. Calidad del agua. Muestreo. Manejo y conservación de muestras.*

NTE INEN 2176:1998: *Agua. Calidad del agua. Muestreo. Técnicas de muestreo.*

NTE INEN 2178:2011: *Aguas minerales. Aguas minerales naturales. Requisitos.*

NORMA TÉCNICA COLOMBIANA NTC 813 (Segunda actualización) 2007: Agua. Agua Potable.

ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA (FAO). *La resistencia a los antimicrobianos, sus mecanismos y epidemiología* [en línea]. 2016.

[Consulta: 11 agosto 2016].

<http://www.fao.org/docrep/007/y5468s/y5468s0d.htm>

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). *Campylobacter* [en línea]. 2011.

[Consulta: 24 agosto 2016].

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs255/es/>

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). *Resistencia a los antimicrobianos* [en línea]. 2016.

[Consulta: 09 agosto 2016].

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>

ORTIZ, Galo; et al. Sánchez. *Plan de desarrollo y ordenamiento territorial de Calacalí 2012-2025.* Pichincha: 2012, pp. 1-88.

PACHECO, Pedro. *El Micrococcus* [en línea]. 2009.

[Consulta: 24 agosto 2016].

<http://es.slideshare.net/pedritopacheco/micrococcus>

PASCUAL, Lola. *Componentes del medio de cultivo* [blog]. 2012

[Consulta: 06 agosto 2016].

<http://siaripre.blogspot.com/2012/10/214-componentes-del-medio-de-cultivo.html>

PEDRIQUE Magaly. *Determinación de la sensibilidad de las bacterias a los antibióticos (antibiograma)*. [en línea] 2002.

[Consulta: 09 agosto 2016].

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwj-zejd5-_NAhWD0h4KHRs7AWoQFggeMAA&url=http%3A%2F%2Fwww.ucv.ve%2Ffileadmin%2Fuser_upload%2Ffacultad_farmacia%2FcatdraMicro%2F10_Antibiograma.pdf&usg=AFQjCNHQ0pa0Q9wM3siG4zS1Xy2b_TLIZw&sig2=HooRDLCjvOcobEV47xyE3Q

PÉREZ, Daza. "Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria", 22, 3, (1998), pp. 57-67.

PÉREZ, José; et al. Rivera. *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias Gram negativas* [en línea]. 2014.

[Consulta: 08 agosto 2016].

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwipnu3EmJ_OAhXDWx4KHV1fCDkQFggeMAA&url=http%3A%2F%2Ffacultad.bayamon.inter.edu%2Fiferrer%2FPresentacion%2520pruebas%2520bioquimicas.pdf&usg=AFQjCNEiKJTfEhCOGvrc84OVlgS5yfeiWQ&sig2=04dSZKq4lmWLIH4M9kH7HA

PÉREZ CANO, Héctor; & ROBLES CONTRERAS, Atzín. "Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana". *Revista Médica MD*, 4, 3, (2013), (México), pp. 186-191. ISSN 2007-2953.

PÍREZ M; & MOTA M. *Morfología y estructura bacteriana* [en línea]. 2006.

[Consulta: 07 agosto 2016].

<https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwiXv6OF243OAhXRuB4KHxHvDr8QFggcMAA&url=http%3A%2F%2Fwww.higiene.edu.uy%2Fcefa%2F2008%2FMorfologiayEstructuraBacteriana.pdf&usg=AFQjCNGyxpkTOUpexGmG46VhF57HmvB4Mw&sig2=O5manSBs9v-4AB9YPKbXPw&bvm=bv.127984354,d.dmo>

PISABARRO. Antonio. *Microbiología General. Cultivo de microorganismos* [en línea]. 2005

[Consulta: 07 agosto 2016].

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=3&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjb89utj4_OAhWPMx4KHbCjDV0QFggpMAI&url=http%3A%2F%2Fwww.unavarra.es%2Fgenmic%2Fmicrogral%2FTema%252002.-%2520Cultivo%2520de%2520microorganismos.pdf&usg=AFQjCNEZflok0yGAUsIVvU91SW76gQgFYQ&sig2=fpa41wjWN6_QJjnHkFqXBg

PLAN NACIONAL PARA EL BUEN VIVIR 2013-2017.

[Consulta: 28 agosto 2016].

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=4&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjo67eT7dzOAhUJx4KHTarCCoQFgg1MAM&url=http%3A%2F%2Fdocumentos.senplades.gob.ec%2FPlan%2520Nacional%2520Buen%2520Vivir%25202013-2017.pdf&usg=AFQjCNGo8q-Zt5JOy7p_5_Sbu1752YSisA&sig2=TJho018X4ZD0e66U3onO9A

PORRAS, Jorge; et al. Nieto. *Calidad y contaminación de las aguas subterráneas en España*

[en línea]. España: 1985.

[Consulta: 02 agosto 2016].

<http://aguas.igme.es/igme/publica/libro43/lib43.htm>

PUERTA GARCÍA, A; & MATEOS RODRÍGUEZ, F. "Enterobacterias". 10, 51 (2010), (España) pp. 3426-3431

PRESCOTT; et al. Harley. *Microbiología*. 5ª ed. Madrid: McGraw-Hill-Interamericana, 2004, pp. 1-1195.

PROCEDIMIENTOS DIAGNÓSTICOS. *Procedimientos de identificación bacteriana. Sistemas manuales y automáticos. Últimas tendencias en identificación* [en línea]. Madrid: 2008. [Consulta: 07 agosto 2016].

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=3&cad=rja&uact=8&sqi=2&ved=0ahUKEwjRhZa5gY_OAhXDlh4KHfTWA20QFggvMAI&url=http%3A%2F%2Fwww.preparadores.eu%2Ftemamuestra%2FPTecnicos%2FDiagnostico.pdf&usg=AFQjCNGhxdbNS3-BakCtyUsfJuCCEjiDQQ&sig2=rtLQDBdXZDvICBSoGm843w

PROCEDIMIENTOS EN MICROBIOLOGÍA CLÍNICA. *Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos* [en línea]. 2000.

[Consultado: 12 agosto 2016]

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=8&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwirvsKrtabOAhUsJMAKHdhKBMEQFghNMAc&url=http%3A%2F%2Fcoesant-seimc.org%2Fdocuments%2FM%25C3%25A9todosB%25C3%25A1sicos_SensibilidadAntibi%25C3%25B3ticos.pdf&usg=AFQjCNHT5kiWWMpSSKjDCea_AQrxdDWIiQ&sig2=OoaMiR1e-m1e7r6XNem5Kw

PRONADISA. *Pruebas para susceptibilidad de bacterias a antibióticos (PSA)* [en línea]. 1960. [Consulta: 11 agosto 2016].

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=6&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwiJm7rP3ZzOAhWEdx4KHcBNDFEQFghDMAU&url=http%3A%2F%2Fwww.condalab.com%2Fpdf%2FAntibiotic_Susceptability_Test_esp_new.pdf&usg=AFQjCNGIXj4Dj2YT4RUQIYxQxOE5_uncyQ&sig2=pkf9cbCoeJcHT1ZL0qBovA

PULLÉS, Robert. "Microorganismos indicadores de la calidad del agua potable". *CENIC Ciencias Biológicas*, 45, 1, (2014), (Cuba) pp. 25-36. ISSN 0253-5688.

QUINTANA, A. *Antibióticos. Bases microbiológicas del uso de antimicrobianos* [en línea]. 2004.

[Consulta: 09 agosto 2016].

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjL-sPDuZzOAhWMPB4KHRITB0MQFggnMAE&url=http%3A%2F%2Fwww.higiene.edu.uy%2Fcefa%2FLibro2002%2FCap%252028.pdf&usg=AFQjCNHeEc6S050bZ-5waWdnRDfL0lxNDQ&sig2=jGx5P_0md0dwdr748yA2OQ

RIVERA, Nadia; et al. Toledano. *Aguas termales de Atotonilco, Morelos, México y sus beneficios terapéuticos* [en línea]. 2011.

[Consulta: 28 agosto 2016].

http://www.tlahui.com/medic/medic32/termas_atotonilco.htm

RODÉS, Benito. *Control de calidad de las aguas minero-medicinales*. Barcelona: 2001, pp. 75-86.

RODRÍGUEZ, G. *Géneros Streptococcus y Enterococcus* [en línea]. 2006.

[Consulta: 24 agosto 2016].

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=7&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjQ_IrPxZLPAhVHPr4KHS8lC1AQFghPMAY&url=http%3A%2F%2Fwww.higiene.edu.uy%2Fcefa%2F2008%2FStreptococcusyEnterococcus.pdf&usg=AFQjCNFmQhxDRXE75WfcdKJF0yAEKB13rA&sig2=ISAS-bQkH08HCZeJ7CyzlQ

RODRÍGUEZ, Iván. *Corynebacterium y otros bacilos Gram positivos no formadores de esporas* [en línea]. 2013.

[Consulta: 24 agosto 2016].

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&cad=rja&uact=8&sqi=2&ved=0ahUKEwiY4vqLzZXPahXLrB4KHSXcC4QQFggqMAE&url=http%3A%2F%2Ffacultad.bayamon.inter.edu%2Fiferrer%2FDiagnostico%2520Clase%25203%25202013%2520Capitulo%252016.pdf&usg=AFQjCNHc32KOv7FaI9rRkSPU_3oKQNbJwg&sig2=WZ08zoqK_hCy4es-8LAX_Q&bvm=bv.133178914,d.cWw

RONCONI, María; et al. Merino. *Caracterización del perfil de susceptibilidad antibiótica de cepas de Enterococcus aisladas de Lactuca sativa (lechuga)* [en línea]. Argentina: 2000 [Consulta: 09 agosto 2016].

<https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=6&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjLtrCH45fOAhWCKh4KHeFpCnkQFghCMAU&url=http%3A%2F%2Fwww.unne.edu.ar%2Funnevieja%2FWeb%2Fcyt%2Fcyt%2F2002%2F03-Medicas%2FM-030.pdf&usg=AFQjCNFh4Qz6zhmPkwjSpzA1ubyZXGVaA&sig2=zf0IEuiupWCmDg6Oe4DIZQ>

RUIZ GALINDO, Eréndira; et al. Martínez. "Caracterización fenotípica de *Staphylococcus epidermidis* aislado de pacientes con endoftalmitis". 146, 2 (2010), (México), pp. 112-117

SAENZ PEÑA, Chaco. *Antibióticos y Antimicrobianos* [en línea]. 2014.

[Consulta: 09 agosto 2016].

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=5&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwilkdzJy5zOAhXQuB4KHc0qDUQQFgg7MAQ&url=http%3A%2F%2Fwww.agrovetmarket.com%2Finvestigacion-salud-animal%2Fpdf-download%2Fantibioticos-y-antimicrobianos&usg=AFQjCNFQi01e_JJv5fn7CL8NzFSetT_7Ew&sig2=oiYesSKQIzMs4LsxTuiTiA

SAN MARTÍN, Josefina. *Piscinas de tratamiento: Higiene y control* [en línea]. Madrid: 2002
[Consulta: 04 agosto 2016].

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=4&ved=0ahUKEwi4v7P_nJLOAhVF0h4KHc_WD6kQFgg1MAM&url=http%3A%2F%2Faguas.igme.es%2Ffigme%2Fpublica%2Fpdfjor_aguas_mine%2F11_piscinas.pdf&usg=AFQjCNHQlsdbqvIgmf6SEk30DGNX18v8TA&sig2=mgE1qpDQe7Nz_ezErTB7eg&bvm=bv.128153897,d.dmo&cad=rja

SÁNCHEZ, J. *Microbiología y Biotecnología* [en línea]. 2005.

[Consulta: 05 agosto 2016].

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=9&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwisho-6mo3OAhVJGB4KHa76Ch8QFghOMAg&url=http%3A%2F%2Fwww.lourdes-luengo.org%2Funidaddesbio%2Fmicrobiologia%2F25Microbiologia.pdf&usg=AFQjCNFk2I-uubiqRbz7kZLfaytrutnJQ&sig2=ZnAbetD1zh_9OcNx8INJjw&bvm=bv.127984354,d.dmo

SANCHÓN, M. *La contaminación del agua* [en línea]. 2011.

[Consulta: 04 agosto 2016].

<https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=3&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwiysf3VmJLOAhUDGR4KHYYT9AkkQFggpMAI&url=http%3A%2F%2Focw.unican.es%2Fciencias-de-la-salud%2Fsalud-publica-y-atencion-primaria-de-salud%2Fotros-recursos-1%2Flecturas%2Fbloque-iii%2FContaminacion%2520del%2520agua.pdf&usg=AFQjCNG2N5kz4Rn2OAzV33tmx-t4OL2gZg&sig2=UgJXtksCaRcIMCCFez55Hg&bvm=bv.128153897,d.dmo>

SANTAMBROSIO, Eduardo; et al. Ortega. *Siembra y recuento de microorganismos* [en línea]. 2009.

[Consulta: 07 agosto 2016].

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=9&cad=rja&uact=8&sqi=2&ved=0ahUKEwierrnO7ZPOAhULpR4KHQwqBnkQFghNMAg&url=https%3A%2F%2Fwww.fro.utn.edu.ar%2F repositorio%2F catedras%2F quimica%2F5_ano%2F biotecnologia%2F practicoIII.pdf&usg=AFQjCNGIn9ux1XjdvLaBCzKVRGLBaViBqg&sig2=ehqjbXurgwl0_SvDnXCUgA&bvm=bv.128153897,d.dmo

SEIJA, V. *Género Staphylococcus* [en línea]. 2006.

[Consulta: 24 agosto 2016].

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=8&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwi32pvIjJXPahXFph4KHZ5UB9YQFghVMAC&url=http%3A%2F%2Fwww.higiene.edu.uy%2F cefa%2F2008%2F Staphylococcus.pdf&usg=AFQjCNEPYOTrUu0E_PXWwfqasq_H99mPJg&sig2=lHmn-fl3jYVTwx1hIryaJA

SEIJA, V.; & VIGNOLI, R. *Principales grupos de antibióticos* [en línea]. 2006.

[Consulta: 09 agosto 2016].

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjL-sPDuZzOAhWMPB4KHRITB0MQFggeMAA&url=http%3A%2F%2Fwww.higiene.edu.uy%2F cefa%2F2008%2F BacteCEFA34.pdf&usg=AFQjCNEJ9qhJLfkKhF_KCLmvFT_E3w8C0g&sig2=qMaXjp8gACT6DILPHf8B-A

TÉCNICAS PARA LA ENUMERACIÓN DE MICROORGANISMOS. *Análisis microbiológico del agua y de otras diversas muestras.* [en línea]. 2012.

[Consulta: 18 agosto 2016].

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjBncKLwIXPAhWLLx4KHbK1APAQFggeMAA&url=http%3A%2F%2Fdepa.fquim.unam.mx%2F amy%2F archivero%2F P7_EnumeracionMicroorganismos_19616.pdf&usg=AFQjCNHlq3iRbjn3V4a2guW5JncYhJbZ-A&sig2=z4Pk0UAgvuC39Wj4ArHtsw

TERMALISMO URUGUAY. *Historia de las aguas termales* [en línea]. 2016.

[Consulta: 28 agosto 2016].

<https://sites.google.com/site/termalismouruguay/the-team/que-son-las-aguas-termales/historia-de-las-aguas-termales>

TORIJA ISASA, Esperanza; et al. García. "Estudio de las características físico-químicas de las aguas del Balneario de La Villa de Olmedo". *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 81, (2015) pp.33-44.

TORIJA ISASA, M^a Esperanza; et al. Orzáez. "Análisis físico-químico de las aguas de los Balnearios de Jaraba". *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 70, (2004), (Madrid) pp. 497-511.

TORRICO, Elizabeth. "Bacilos Gram negativos no fermentadores: *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*, *Burkholderia*". 2010. pp. 319-340.

UK STANDARDS FOR MICROBIOLOGY INVESTIGATIONS. England: Identification of *Staphylococcus* species, *Micrococcus* species and *Rothia* species, 2014, pp. 12-13.

UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA. *Pruebas bioquímicas y aislamiento* [en línea]. 2011.

[Consulta: 08 agosto 2016].

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=7&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwiYgbnQ3JTOAhWFox4KHTnRCfgQFghEMAY&url=http%3A%2F%2Fwww.ramos.utfsm.cl%2Fdoc%2F530%2Fsc%2FLABORATORIO_5.pdf&usg=AFQjCNEbK9Jo94ILuuiM0-n1L4L_vPctmw&sig2=E_ig_kHTHxCMyueOzZXJ9Q

UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA. *Recuento Bacteriano y análisis de agua* [en línea]. 2011.

[Consulta: 07 agosto 2016].

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=11&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwiiqYiIxpTOAhXFJx4KHd5uAisQFghQMAo&url=http%3A%2F%2Fwww.ramos.utfsm.cl%2Fdoc%2F530%2Fsc%2FLABORATORIO_3.pdf&usg=AFQjCNFPxenRCsrY1-OaO143gLjUgeK27A&sig2=xik8sZ6pfeO_HHRC11lv-g

VÁZQUEZ, Sylvia; et al. O'Neill. *Importancia de los coliformes en los alimentos* [en línea]. 2013.

[Consulta: 18 agosto 2016].

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=8&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjyNyE0YPPAhVHXR4KHTnbBIMQFgg-MAC&url=http%3A%2F%2Fwww.montevideo.gub.uy%2Fsites%2Fdefault%2Ffiles%2Fimportancia_de_los_coliformes_en_los_alimentos.pdf&usg=AFQjCNEkzt_4BRTBOf2XaJsDfxVKy2f3aQ&sig2=3qgUk8Gswj2bDhQE7h_c7Q

VELA, A; et al. Gracia. "Isolation of *Corynebacterium xerosis* from Animal Clinical Specimens". *Journal of Clinical Microbiology* [en línea], 2006, 44(6), pp. 2242-2243.

[Consulta: 24 agosto 2016].

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1489389/>

VENDRELL, M; et al. Torres. "Estudio de microorganismos patógenos en la fuente termal de O Tinteiro en Ourense". *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 2, 2 (1998), (México) pp. 92-95

WIKIPEDIA. *Ácido nalidíxico* [en línea]. 2016.

[Consultado: 12 agosto 2016].

https://es.wikipedia.org/wiki/%C3%81cido_nalid%C3%ADxico

WINN, Washington; et al. Allen. *Koneman Diagnóstico microbiológico Texto y Atlas en color.*
6ª ed. Buenos Aires, Bogotá: Panamericana, 2006, pp. 1-1382.

ANEXOS

ANEXO A: Balneario “El Cachaco”.



Fotografía N°1: Letrero del Balneario.

Realizado por: CORTES Sandra, 2016



Fotografía N°2: Entrada principal del Balneario.

Realizado por: CORTES Sandra, 2016

ANEXO B: Puntos muestreados para el estudio microbiológico.



Fotografía N°3: Vertiente pequeña (M1)

Realizado por: CORTES Sandra, 2016



Fotografía N°4: Punto 1 de surgencia del agua termal (M2)

Realizado por: CORTES Sandra, 2016



Fotografía N°5: Piscina del Balneario (M3 y M5)

Realizado por: CORTES Sandra, 2016



Fotografía N°6: Punto 2 de surgencia del agua termal (M4)

Realizado por: CORTES Sandra, 2016

ANEXO C: Medición in situ de los parámetros físico-químicos del agua termal.



Fotografía N°7: Medición de la temperatura del punto de muestreo M1.

Realizado por: CORTES Sandra, 2016



Fotografía N°8: Medición del pH del punto de muestreo M1.

Realizado por: CORTES Sandra, 2016

ANEXO D: Siembra de las muestras de agua termal en las placas 3M Petrifilm, en el agar eosina azul de metileno y en el agar manitol salado.



Fotografía N°9: Siembra en las placas Petrifilm para el recuento de bacterias aerobias mesófilas.

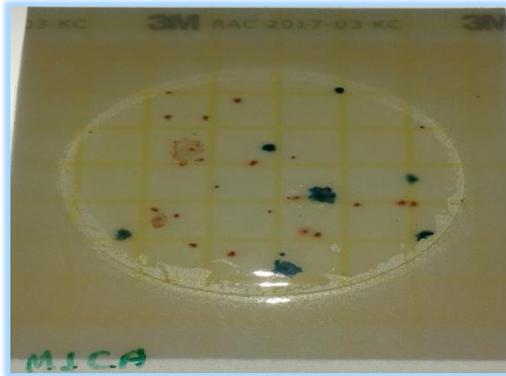
Realizado por: CORTES Sandra, 2016



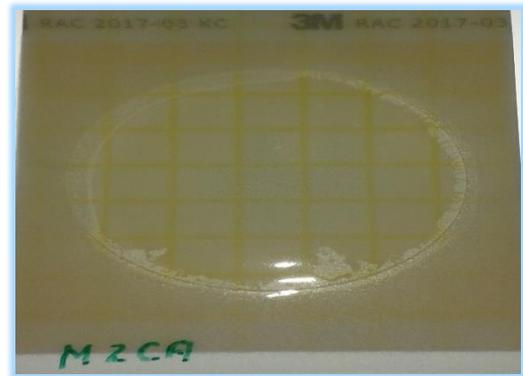
Fotografía N°10: Siembra en placas Petrifilm para el recuento de *E. coli* y coliformes, agar eosina azul de metileno y agar manitol salado.

Realizado por: CORTES Sandra, 2016

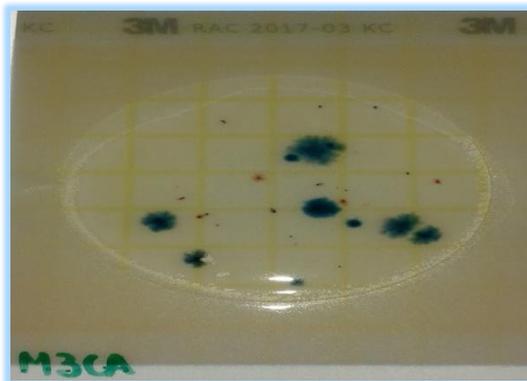
ANEXO E: Resultados del recuento bacteriano en cada sitio muestreado transcurridas 24 horas.
(primer muestreo)



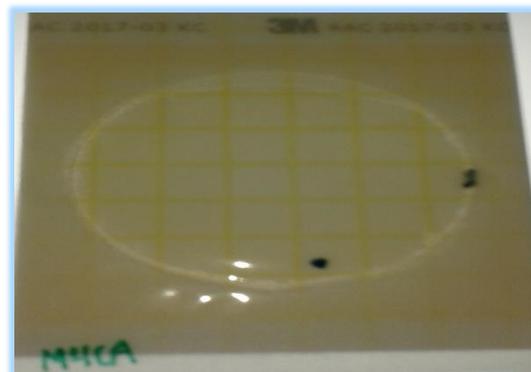
Fotografía N°11: Placa Petrifilm para el recuento de Aerobios mesófilos del sitio M1.
Realizado por: CORTES Sandra, 2016



Fotografía N°12: Placa Petrifilm para el recuento de Aerobios mesófilos del sitio M2.
Realizado por: CORTES Sandra, 2016



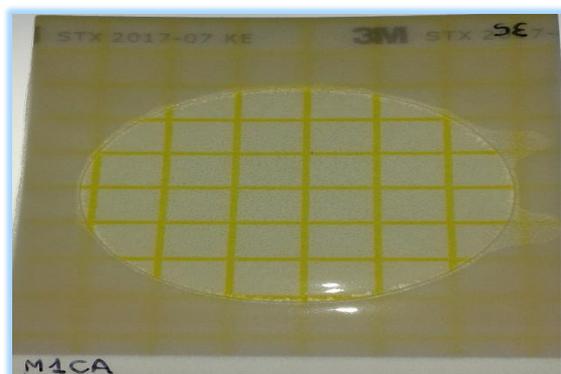
Fotografía N°13: Placa Petrifilm para el recuento de Aerobios mesófilos del sitio M3.
Realizado por: CORTES Sandra, 2016



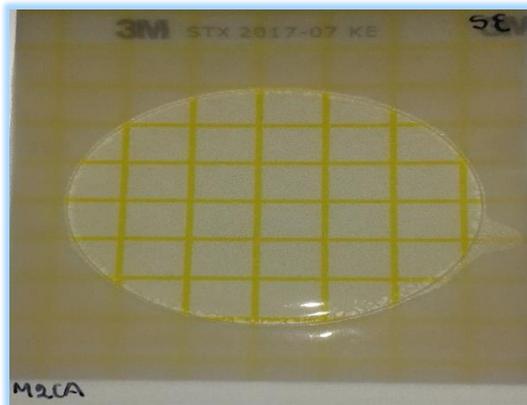
Fotografía N°14: Placa Petrifilm para el recuento de Aerobios mesófilos del sitio M4.
Realizado por: CORTES Sandra, 2016



Fotografía N°15: Placa Petrifilm para el recuento de Aerobios mesófilos del sitio M5.
Realizado por: CORTES Sandra, 2016

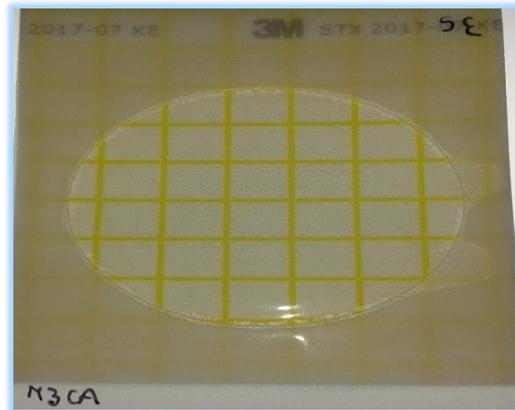


Fotografía N°16: Petrifilm para el recuento de *Staphylococcus aureus* del sitio M1.
Realizado por: CORTES Sandra, 2016



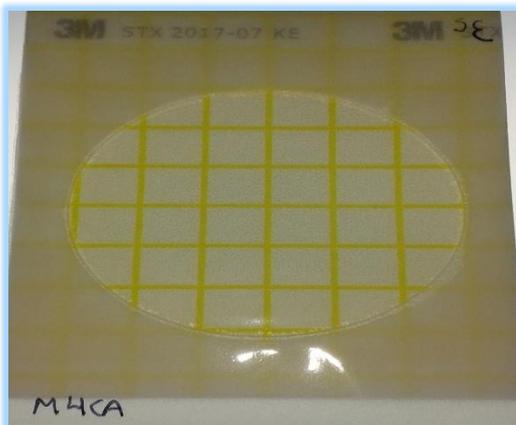
Fotografía N°17: Petrifilm para el recuento de *Staphylococcus aureus* del sitio M2.

Realizado por: CORTES Sandra, 2016



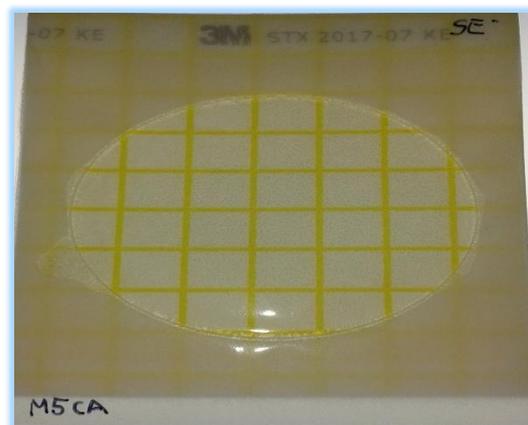
Fotografía N°18: Petrifilm para el recuento de *Staphylococcus aureus* del sitio M3.

Realizado por: CORTES Sandra, 2016



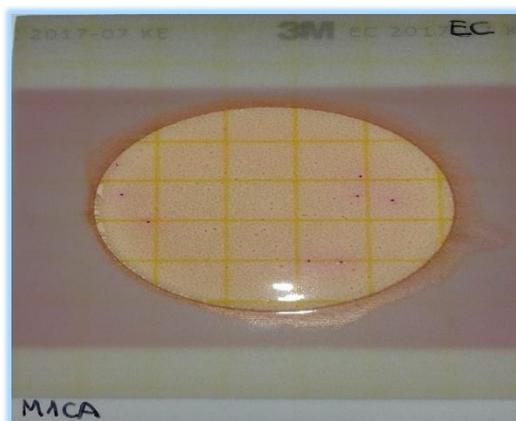
Fotografía N°19: Petrifilm para el recuento de *Staphylococcus aureus* del sitio M4.

Realizado por: CORTES Sandra, 2016



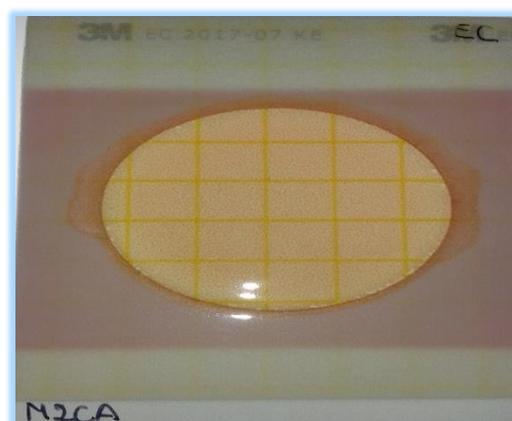
Fotografía N°20: Petrifilm para el recuento de *Staphylococcus aureus* del sitio M5.

Realizado por: CORTES Sandra, 2016



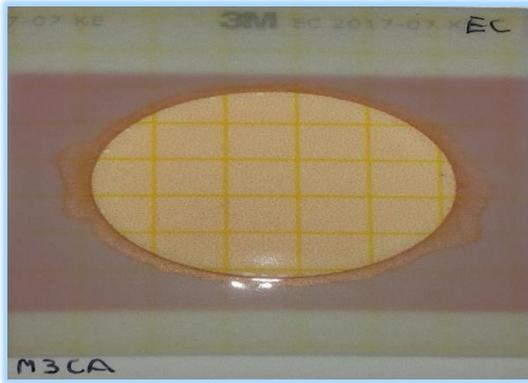
Fotografía N°21: Petrifilm para el recuento de *E. coli* y Coliformes del sitio M1.

Realizado por: CORTES Sandra, 2016



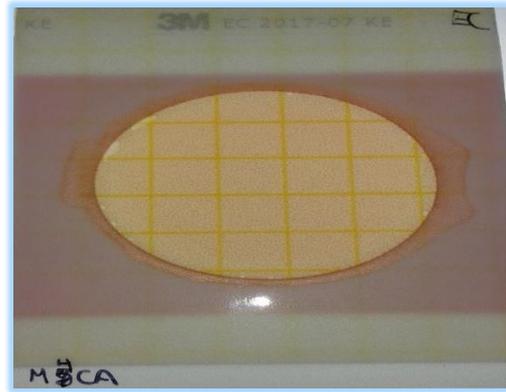
Fotografía N°22: Petrifilm para el recuento de *E. coli* y Coliformes del sitio M2.

Realizado por: CORTES Sandra, 2016



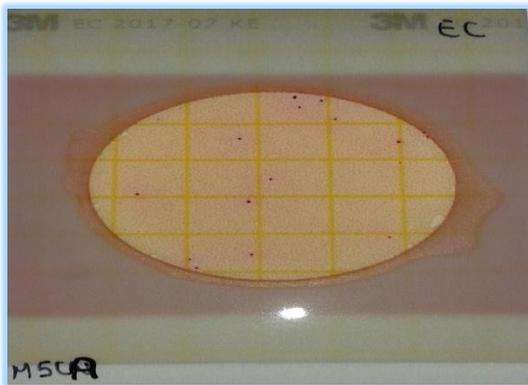
Fotografía N°23: Petrifilm para el recuento de *E. coli* y Coliformes del sitio M3.

Realizado por: CORTES Sandra, 2016



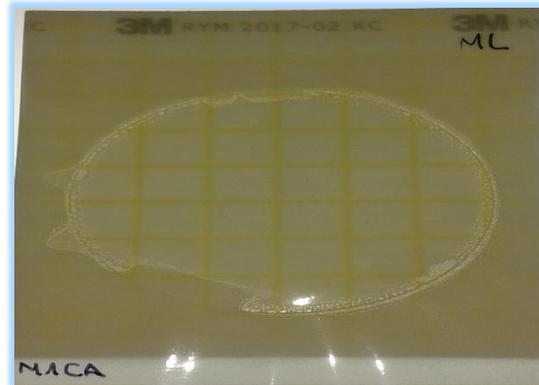
Fotografía N°24: Petrifilm para el recuento de *E. coli* y Coliformes del sitio M4.

Realizado por: CORTES Sandra, 2016



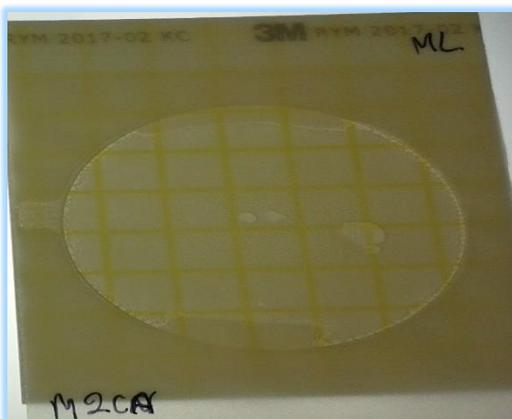
Fotografía N°25: Petrifilm para el recuento de *E. coli* y Coliformes del sitio M5.

Realizado por: CORTES Sandra, 2016



Fotografía N°26: Petrifilm para el recuento de mohos y levaduras del sitio M1.

Realizado por: CORTES Sandra, 2016



Fotografía N°27: Petrifilm para el recuento de mohos y levaduras del sitio M2.

Realizado por: CORTES Sandra, 2016



Fotografía N°28: Petrifilm para el recuento de mohos y levaduras del sitio M3.

Realizado por: CORTES Sandra, 2016



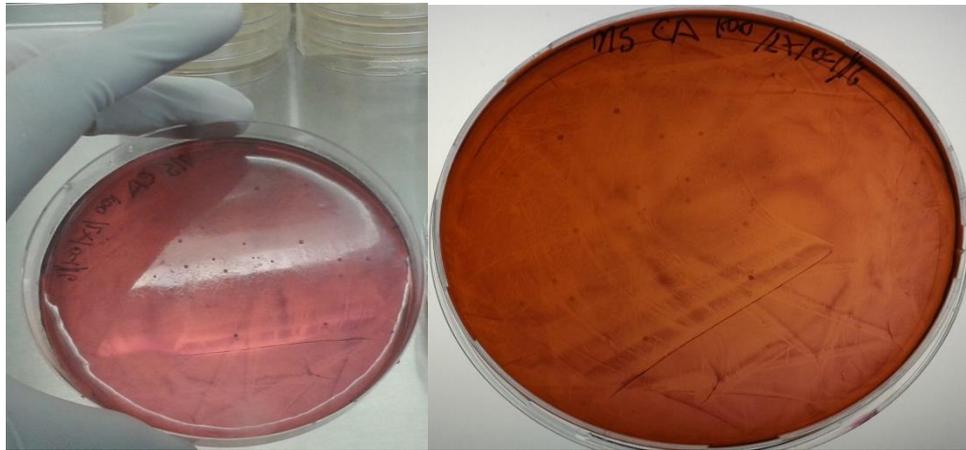
Fotografía N°29: Petrifilm para el recuento de mohos y levaduras del sitio M4.

Realizado por: CORTES Sandra, 2016



Fotografía N°30: Petrifilm para el recuento de mohos y levaduras del sitio M5.

Realizado por: CORTES Sandra, 2016



Fotografía N°31: Recuento de colonias crecidas y de las que fermentaron la lactosa en el agar eosina azul de metileno del sitio muestreado M5 (100uL).

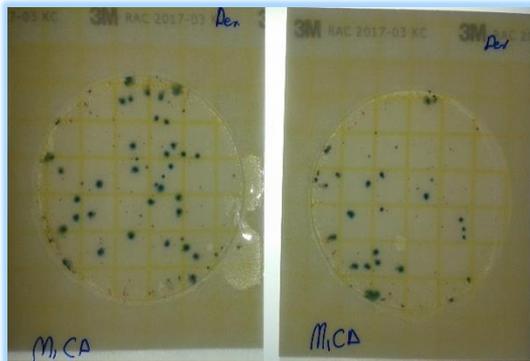
Realizado por: CORTES Sandra, 2016



Fotografía N°32: Recuento de colonias crecidas y de las que fermentaron el manitol en el agar manitol salado del sitio muestreado M5 (20uL).

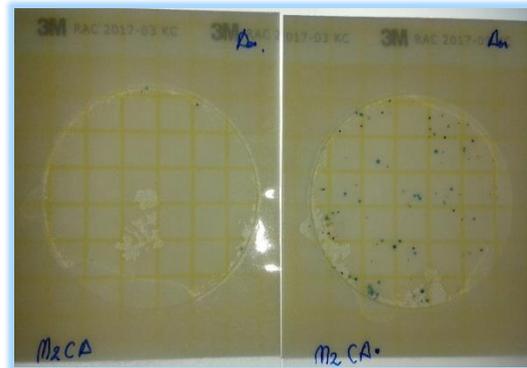
Realizado por: CORTES Sandra, 2016

ANEXO F: Resultados del recuento bacteriano en cada sitio muestreado transcurridas 24 horas.
(segundo muestreo)



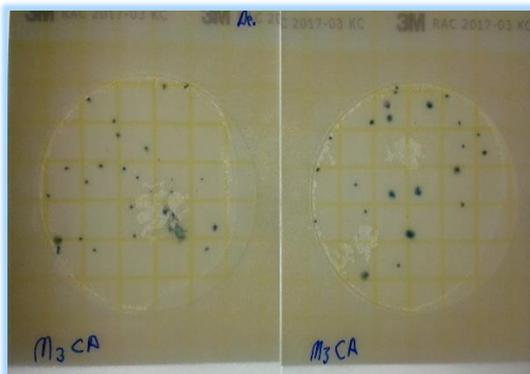
Fotografía 33: Placas para el recuento de Aerobios mesófilos del sitio M1.

Realizado por: CORTES Sandra, 2016



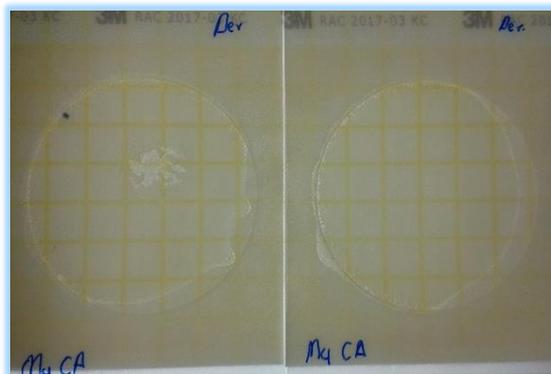
Fotografía N°34: Placas para el recuento de Aerobios mesófilos del sitio M2.

Realizado por: CORTES Sandra, 2016



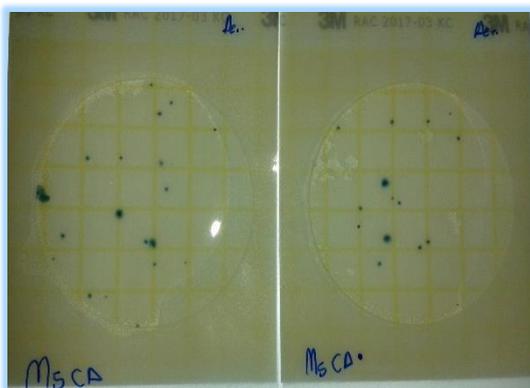
Fotografía 35: Placas para el recuento de Aerobios mesófilos del sitio M3.

Realizado por: CORTES Sandra, 2016



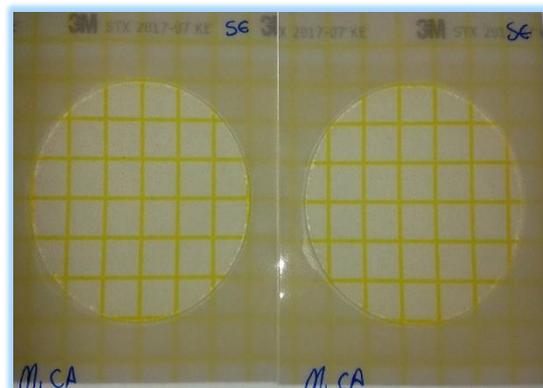
Fotografía N°36: Placas para el recuento de Aerobios mesófilos del sitio M4.

Realizado por: CORTES Sandra, 2016



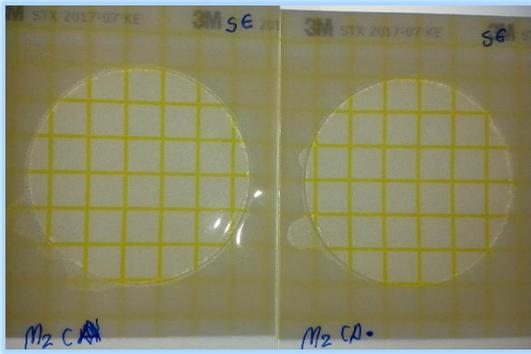
Fotografía 37: Placas para el recuento de Aerobios mesófilos del sitio M5.

Realizado por: CORTES Sandra, 2016



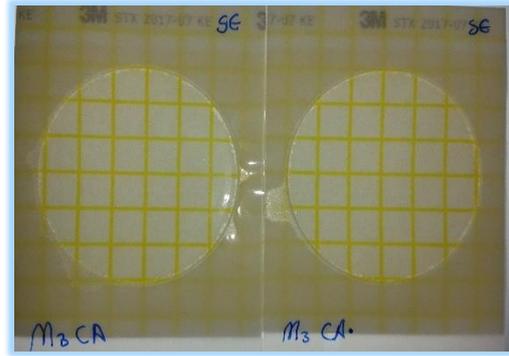
Fotografía N°38: Placas para el recuento de *Staphylococcus aureus* del sitio M1.

Realizado por: CORTES Sandra, 2016



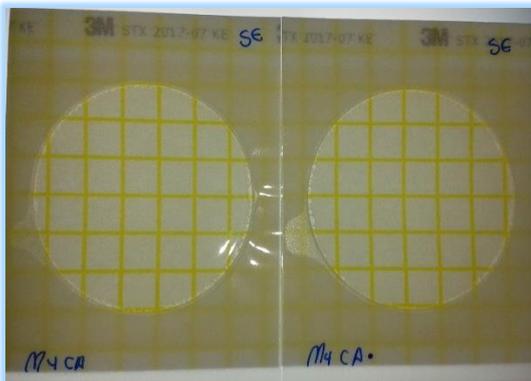
Fotografía 39: Placas para el recuento de *Staphylococcus aureus* del sitio M2.

Realizado por: CORTES Sandra, 2016



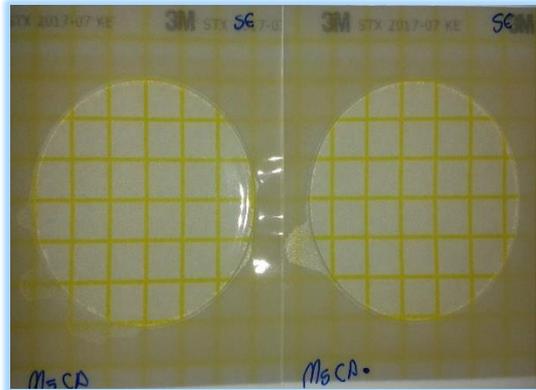
Fotografía N°40: Placas para el recuento de *Staphylococcus aureus* del sitio M3.

Realizado por: CORTES Sandra, 2016



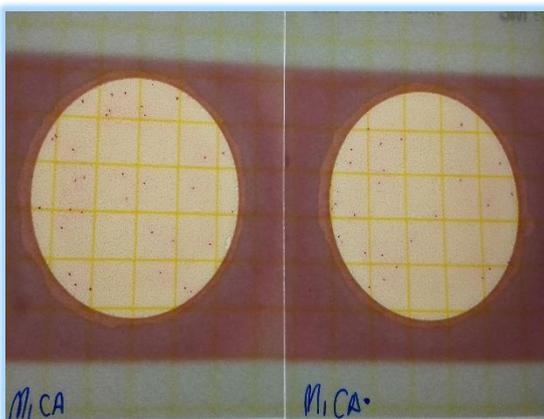
Fotografía 41: Placas para el recuento de *Staphylococcus aureus* del sitio M4.

Realizado por: CORTES Sandra, 2016



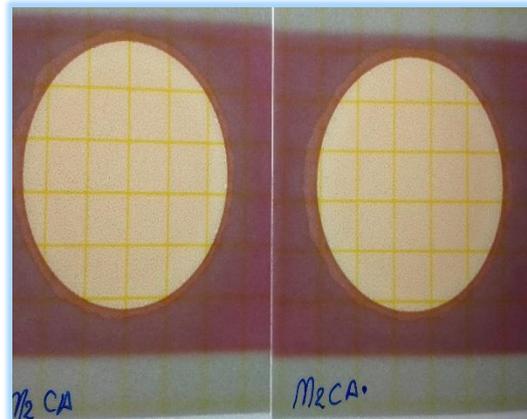
Fotografía N°42: Placas para el recuento de *Staphylococcus aureus* del sitio M5.

Realizado por: CORTES Sandra, 2016



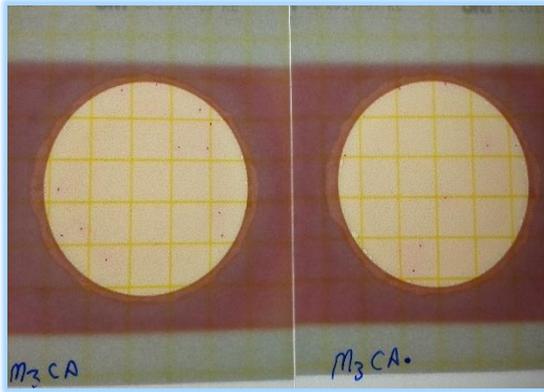
Fotografía 43: Placas para el recuento de *E. coli* y Coliformes del sitio M1.

Realizado por: CORTES Sandra, 2016



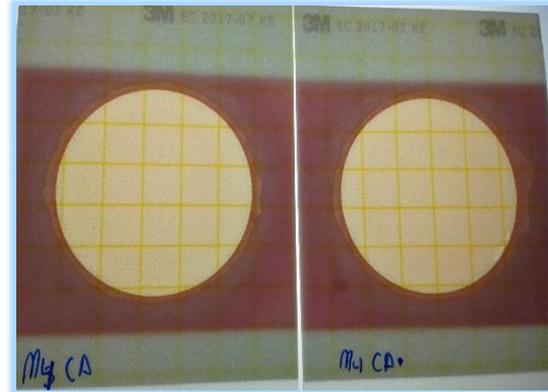
Fotografía N°44: Placas para el recuento de *E. coli* y Coliformes del sitio M2.

Realizado por: CORTES Sandra, 2016



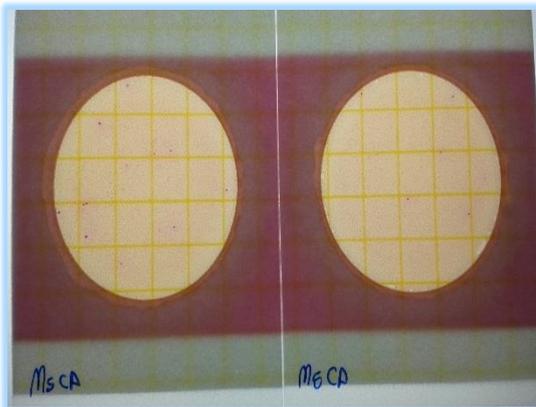
Fotografía 45: Placas para el recuento de *E. coli* y Coliformes del sitio M3.

Realizado por: CORTES Sandra, 2016



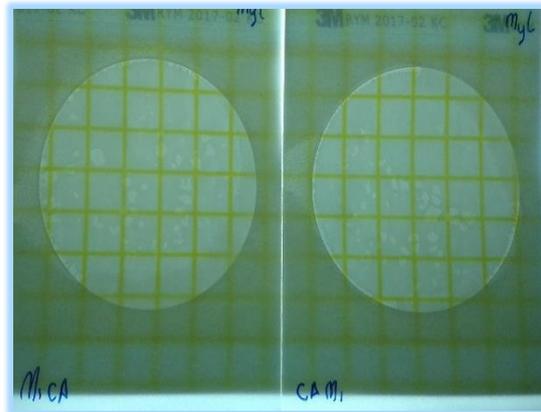
Fotografía N°46: Placas para el recuento de *E. coli* y Coliformes del sitio M4.

Realizado por: CORTES Sandra, 2016



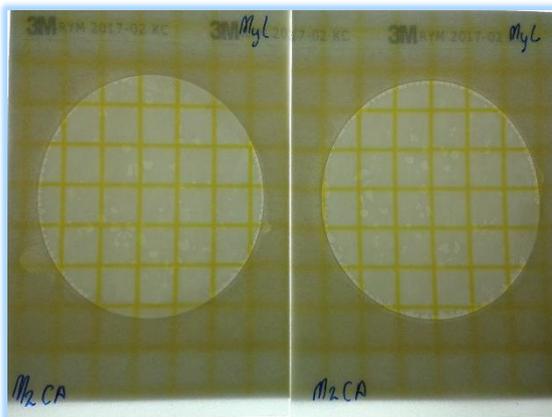
Fotografía 47: Placas para el recuento de *E. coli* y Coliformes del sitio M5.

Realizado por: CORTES Sandra, 2016



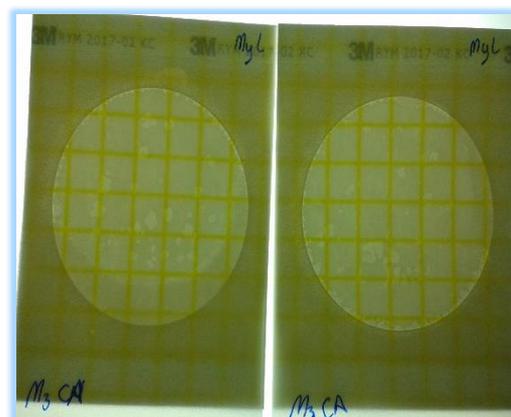
Fotografía N°48: Placas para el recuento de mohos y levaduras del sitio M1.

Realizado por: CORTES Sandra, 2016



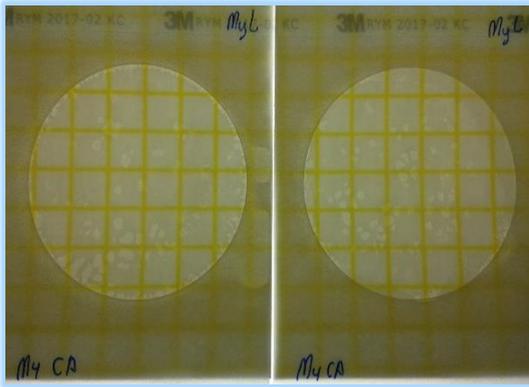
Fotografía 49: Placas para el recuento de mohos y levaduras del sitio M2.

Realizado por: CORTES Sandra, 2016



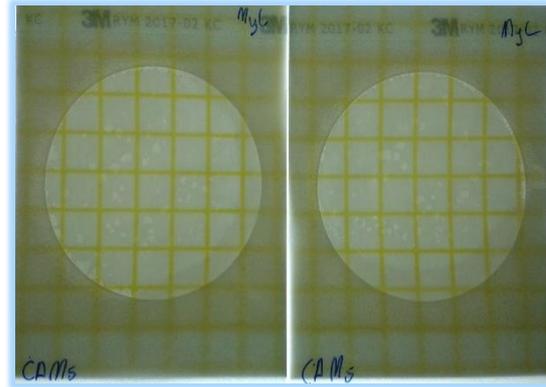
Fotografía N°50: Placas para el recuento de mohos y levaduras del sitio M3.

Realizado por: CORTES Sandra, 2016



Fotografía 51: Placas para el recuento de mohos y levaduras del sitio M4.

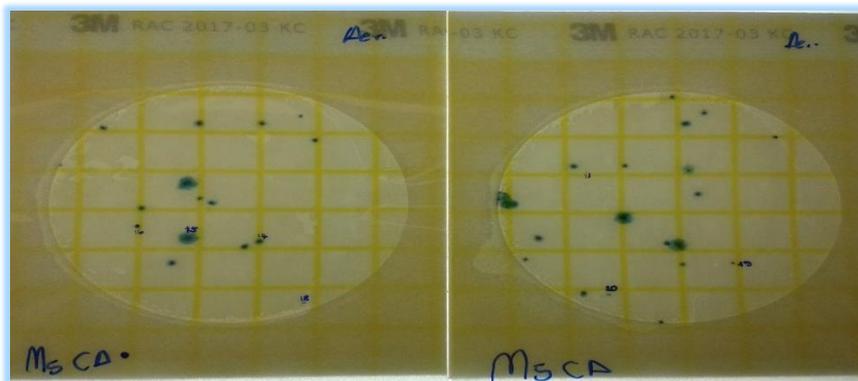
Realizado por: CORTES Sandra, 2016



Fotografía N°52: Placas para el recuento de mohos y levaduras del sitio M5.

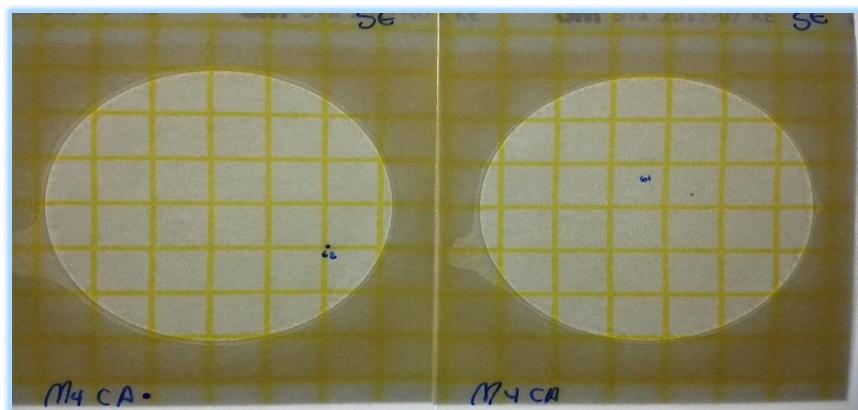
Realizado por: CORTES Sandra, 2016

ANEXO G: Algunas colonias bacterianas que se seleccionaron para los repiques.



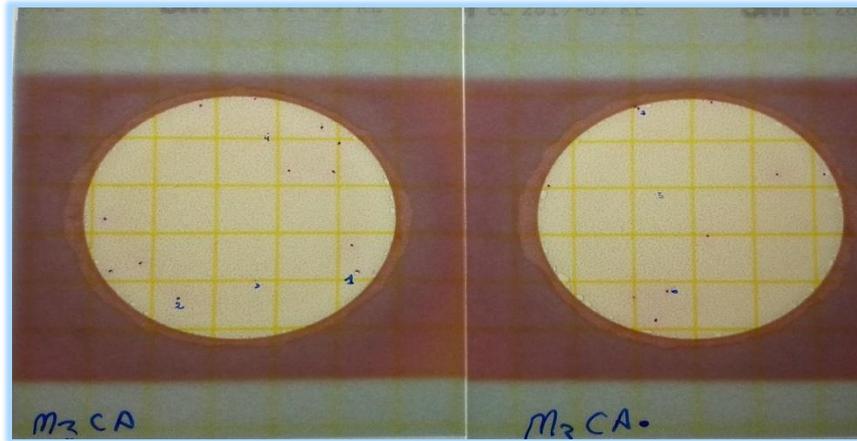
Fotografía 53: Colonias elegidas para los repiques de los Petrifilms para el recuento de Aerobios mesófilos del sitio M5.

Realizado por: CORTES Sandra, 2016



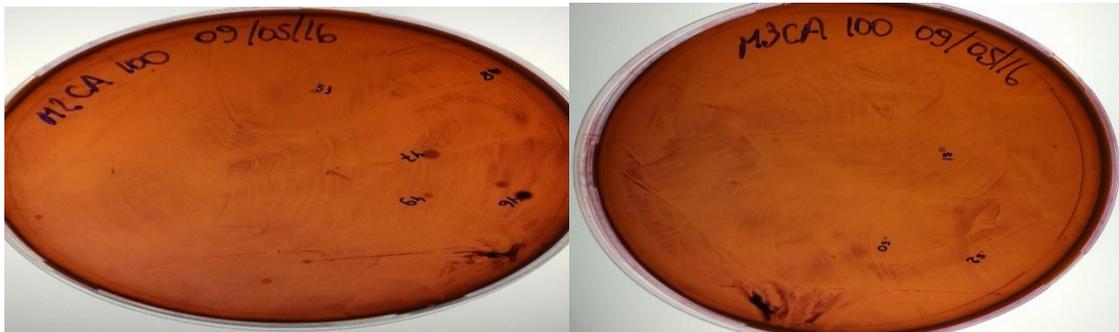
Fotografía 54: Colonias elegidas para los repiques de los Petrifilms para el recuento de *Staphylococcus aureus* del sitio M4.

Realizado por: CORTES Sandra, 2016



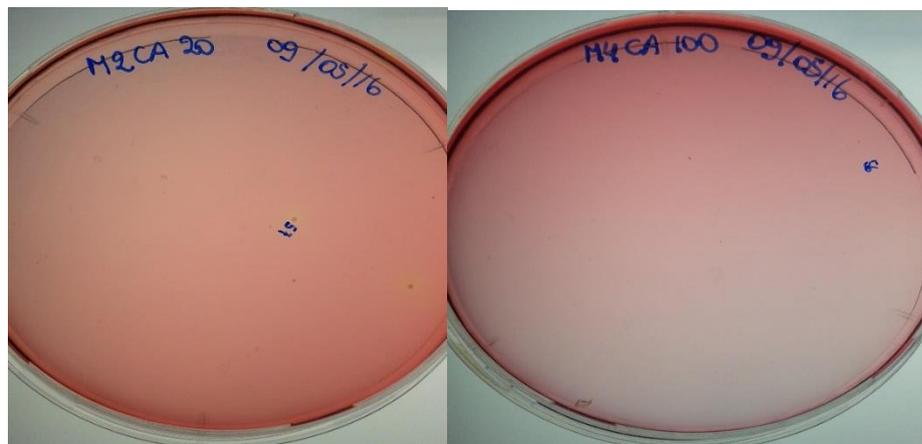
Fotografía 55: Colonias elegidas para los repiques de los Petrifilms para el recuento de *E. coli* y Coliformes del sitio M3.

Realizado por: CORTES Sandra, 2016



Fotografía 56: Colonias elegidas para los repiques del agar eosina azul de metileno de los puntos muestreados M2 y M3.

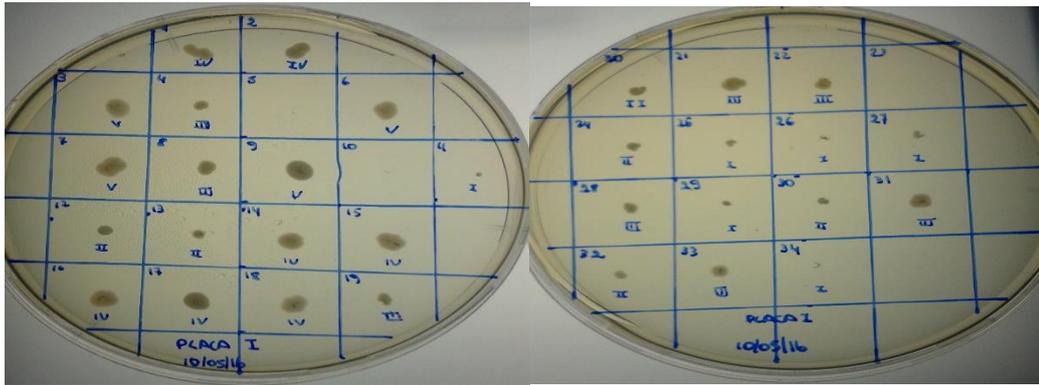
Realizado por: CORTES Sandra, 2016



Fotografía 57: Colonias elegidas para los repiques del agar manitol salado de los puntos muestreados M2 y M4.

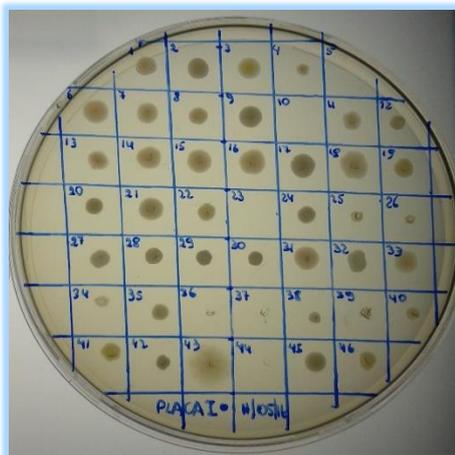
Realizado por: CORTES Sandra, 2016

ANEXO H: Repiques de las colonias bacterianas.



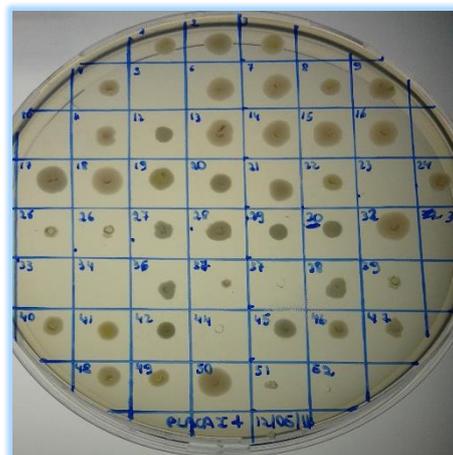
Fotografía 58: Repique 1 de los clones bacterianos 1-34.

Realizado por: CORTES Sandra, 2016



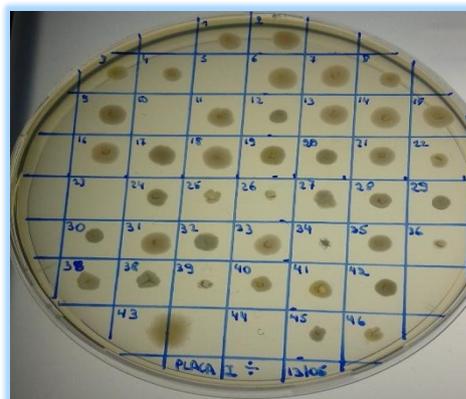
Fotografía 59: Repique 2 de los clones bacterianos 1-34.

Realizado por: CORTES Sandra, 2016



Fotografía 60: Repique 3 de los clones bacterianos 1-34.

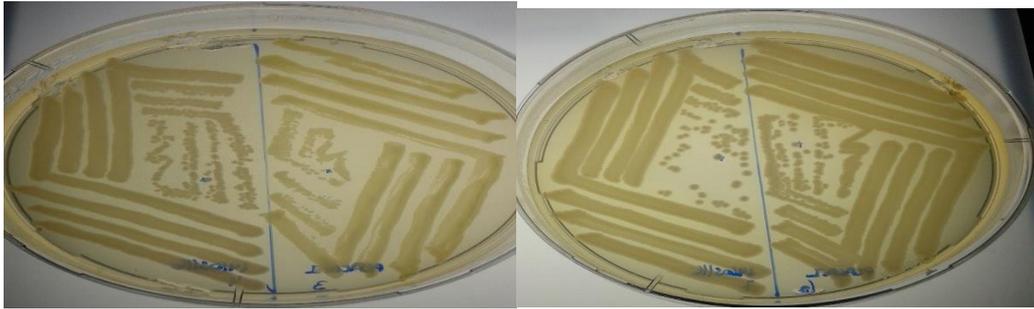
Realizado por: CORTES Sandra, 2016



Fotografía 61: Repique 4 de los clones bacterianos 1-34.

Realizado por: CORTES Sandra, 2016

ANEXO I: Siembra de las colonias bacterianas por agotamiento de estrias.



Fotografía N°62: Estrias de las colonias bacterianas 3,4,6,7

Realizado por: CORTES Sandra, 2016

ANEXO J: Clones bacterianos puros.



Fotografía N°63: Clones puros

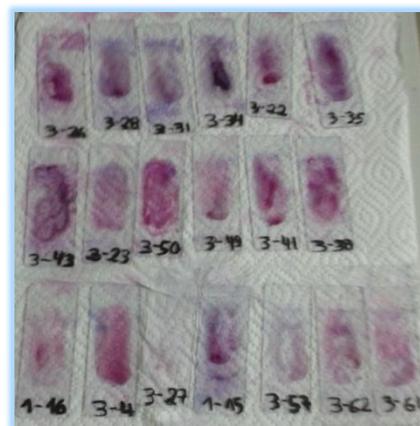
Realizado por: CORTES Sandra, 2016

ANEXO K: Tinción Gram de los clones bacterianos puros.



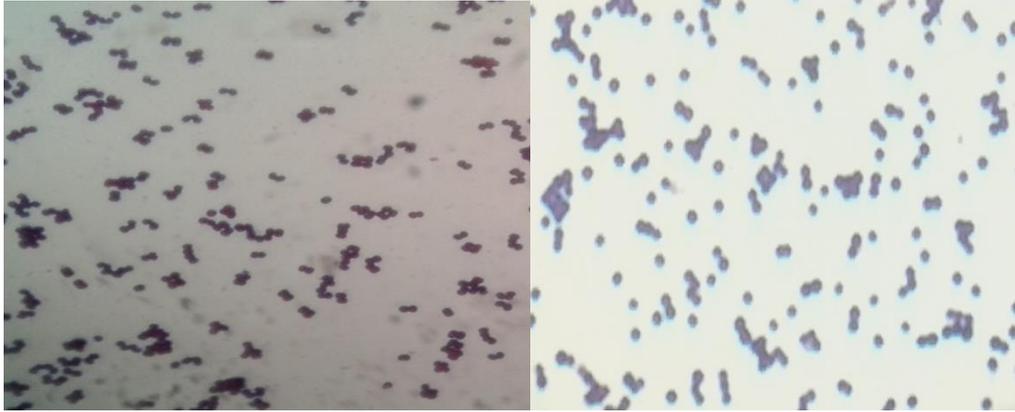
Fotografía N°64: Procedimiento de la tinción Gram.

Realizado por: CORTES Sandra, 2016



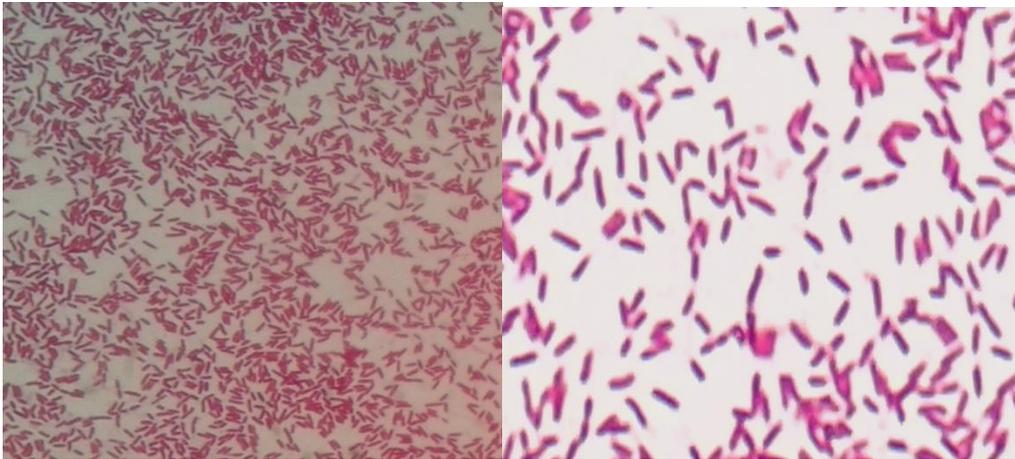
Fotografía N°65: Placas de tinción Gram.

Realizado por: CORTES Sandra, 2016



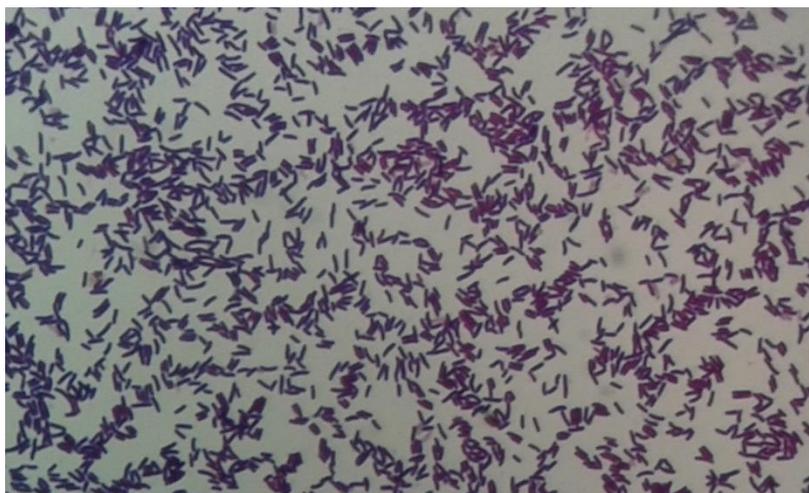
Fotografía N°66: Cocos Gram positivos.

Realizado por: CORTES Sandra, 2016



Fotografía N°67: Bacilos Gram negativos

Realizado por: CORTES Sandra, 2016



Fotografía N°68: Bacilos Gram positivos.

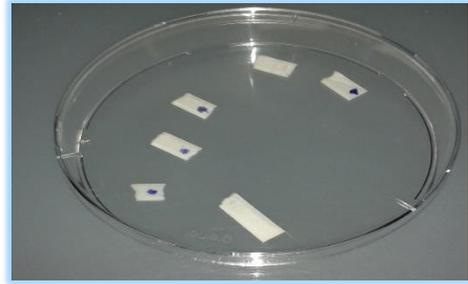
Realizado por: CORTES Sandra, 2016

ANEXO L: Prueba de la catalasa y oxidasa de los clones bacterianos puros.



Fotografía N°69: Prueba de la catalasa

Realizado por: CORTES Sandra, 2016



Fotografía N°70: Prueba de la oxidasa

Realizado por: CORTES Sandra, 2016

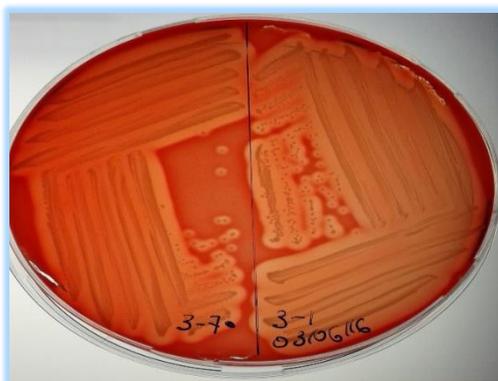
ANEXO M: Prueba de la oxidación fermentación.



Fotografía N°71: Resultados de la prueba de oxidación fermentación (inerte y fermentación)

Realizado por: CORTES Sandra, 2016

ANEXO N: Siembra en agar sangre e identificación de hemólisis.



Fotografía N°72: Beta hemólisis

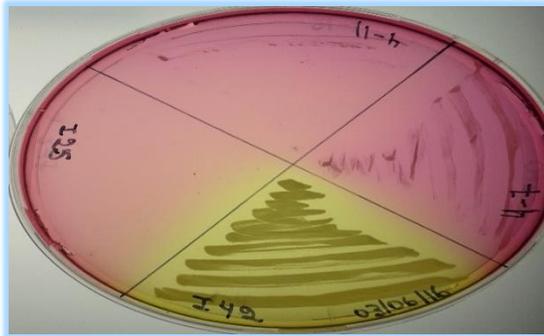
Realizado por: CORTES Sandra, 2016



Fotografía N°73: Gamma y alfa hemólisis.

Realizado por: CORTES Sandra, 2016

ANEXO Ñ: Pruebas de identificación de los cocos Gram positivos



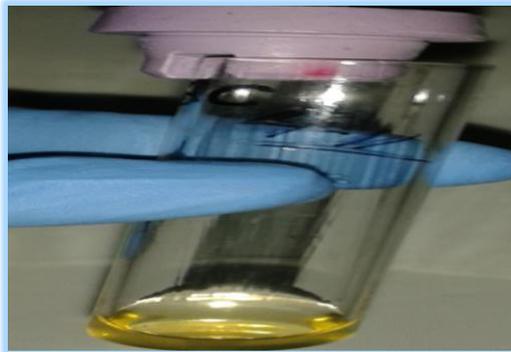
Fotografía N°74: Resultados de la siembra en agar manitol salado.

Realizado por: CORTES Sandra, 2016



Fotografía N°75: Resultado negativo para la prueba de la coagulasa.

Realizado por: CORTES Sandra, 2016



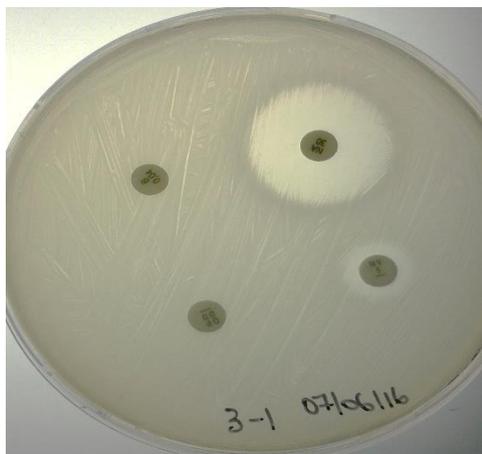
Fotografía N°76: Ausencia de crecimiento en caldo hipersalino al 6.5%

Realizado por: CORTES Sandra, 2016



Fotografía N°77: Prueba de úrea y el medio Kligler.

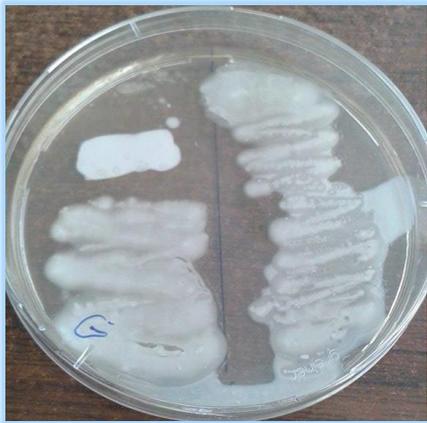
Realizado por: CORTES Sandra, 2016



Fotografía N°78: Pruebas de diferenciación bacteriana por sensibilidad o resistencia a los antibióticos ácido nalidíxico, optoquina, bacitracina y novobiocina.

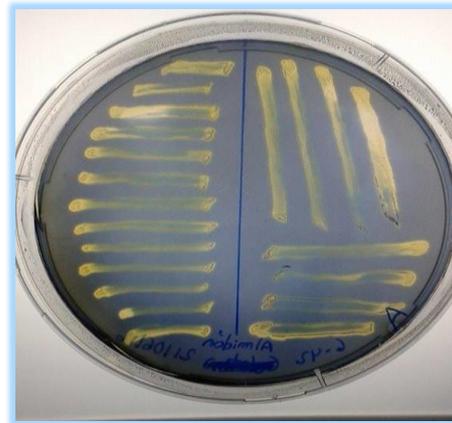
Realizado por: CORTES Sandra, 2016

ANEXO O: Pruebas de identificación del bacilo Gram positivo



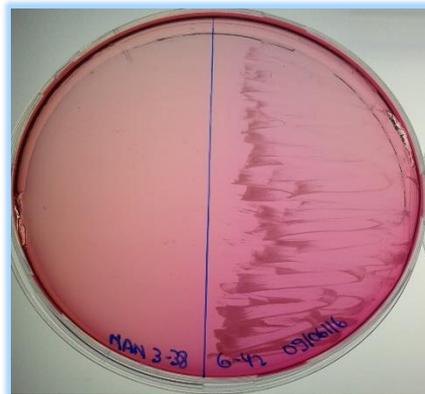
Fotografía N° 79: Prueba de la hidrólisis de la gelatina.

Realizado por: CORTES Sandra, 2016



Fotografía N°80: Prueba de la hidrólisis del almidón.

Realizado por: CORTES Sandra, 2016



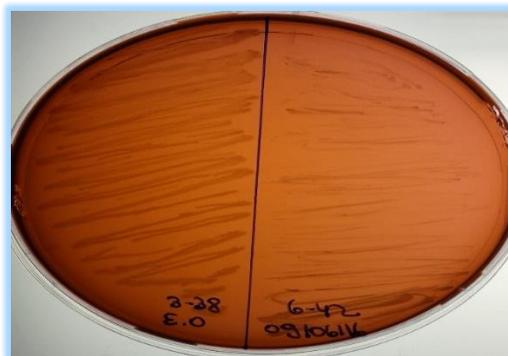
Fotografía N°81: Crecimiento en agar manitol salado (6-42)

Realizado por: CORTES Sandra, 2016



Fotografía N°82: Ausencia de crecimiento en agar MacConkey (6-42)

Realizado por: CORTES Sandra, 2016



Fotografía N°83: Ausencia de crecimiento en agar eosina azul de metileno (6-42)

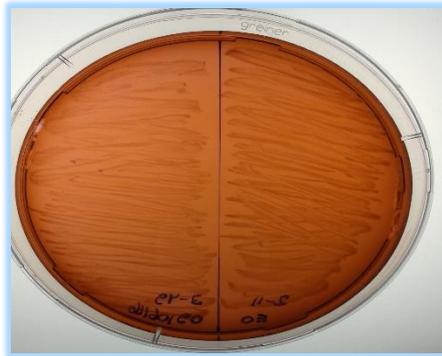
Realizado por: CORTES Sandra, 2016



Fotografía N°84: Pruebas bioquímicas (6-42)

Realizado por: CORTES Sandra, 2016

ANEXO P: Pruebas de identificación de los bacilos Gram negativos



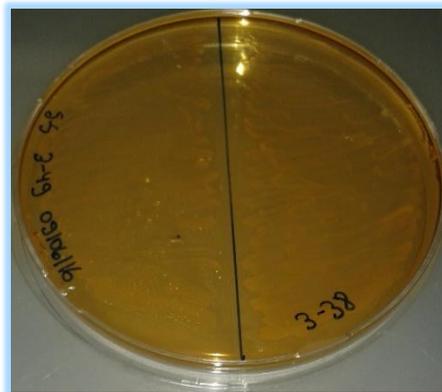
Fotografía N°85: Siembra en agar eosina azul de metileno.

Realizado por: CORTES Sandra, 2016



Fotografía N°86: Siembra en agar MacConkey.

Realizado por: CORTES Sandra, 2016



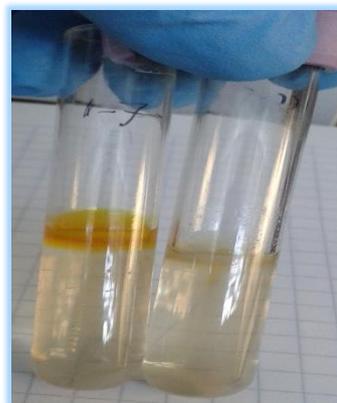
Fotografía N°87: Siembra en agar *Salmonella Shigella*.

Realizado por: CORTES Sandra, 2016



Fotografía N°88: Resultados de las pruebas bioquímicas.

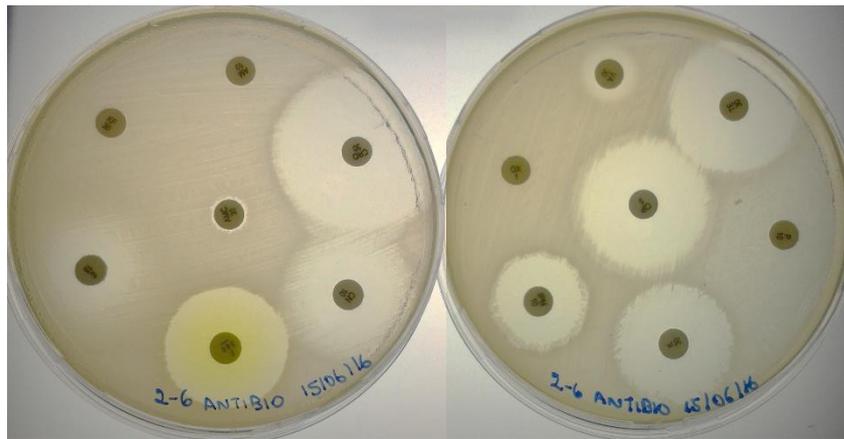
Realizado por: CORTES Sandra, 2016



Fotografía N°89: Prueba del indol.

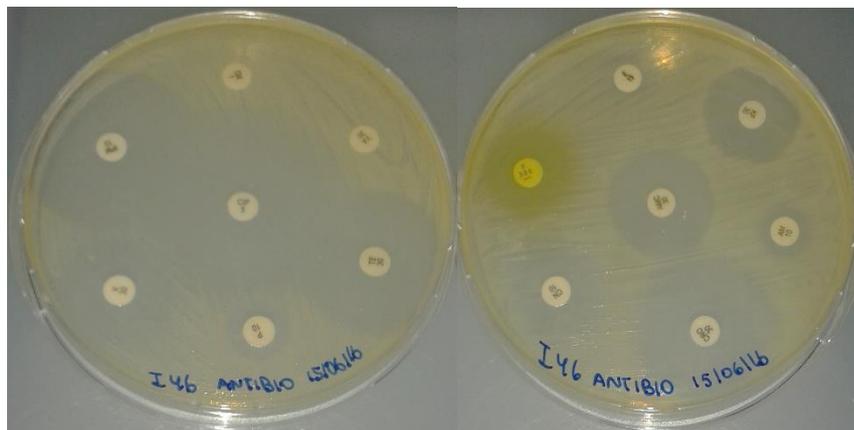
Realizado por: CORTES Sandra, 2016

ANEXO Q: Antibiogramas de las especies bacterianas identificadas.



Fotografía N°90: *Streptococcus viridans*

Realizado por: CORTES Sandra, 2016



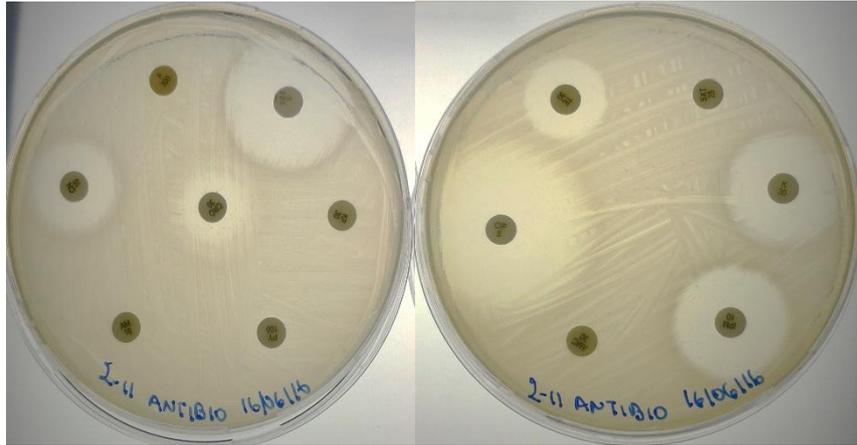
Fotografía N°91: *Streptococcus viridans*

Realizado por: CORTES Sandra, 2016



Fotografía N°92: *Corynebacterium* spp.

Realizado por: CORTES Sandra, 2016



Fotografía N°93: *Pseudomonas spp.*

Realizado por: CORTES Sandra, 2016