



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

**“ESTUDIO MICROBIOLÓGICO DE LAS AGUAS TERMALES  
DEL BALNEARIO CUNUNYACU UBICADO EN LAS FALDAS  
NOROCCIDENTALES DEL CERRO ILALÓ DE LA PARROQUIA  
TUMBACO PERTENECIENTE A LA PROVINCIA DE  
PICHINCHA”**

Trabajo de titulación presentado para optar al grado académico de:

**BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA**

**AUTORA: SUSANA MARGOTH GUALLPA UVIDIA**

**TUTOR: DR. GERARDO EMILIO MEDINA RAMÍREZ**

Riobamba – Ecuador

2016

©2016, Susana Margoth Gualpa Uvidia

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 CUNUNYACU UBICADO EN LAS FALDAS NOROCCIDENTALES DEL CERRO ILALÓ DE LA PARROQUIA TUMBACO PERTENECIENTE A LA PROVINCIA DE PICHINCHA**”, de responsabilidad de la señorita Susana Margoth Guallpa Uvidia, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Titulación, quedando autorizada su presentación.

**FIRMA**

**FECHA**

**Dr. Gerardo Medina**  
**DIRECTOR DEL**  
**TRABAJO DE TITULACIÓN**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**Dr. Carlos Espinoza**  
**MIEMBRO DE TRIBUNAL**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Yo, Susana Margoth Gualpa Uvidia, 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.

-----  
SUSANA MARGOTH GUALLPA UVIDIA

060346149-2

## **DEDICATORIA**

El presente trabajo va dedicado con todo mi amor a Dios por ser la luz que guía mi camino, ser mi amigo fiel y ser mi sostén en los momentos de debilidad.

A mis padres, Lilia y Washington por brindarme su amor incondicional, su comprensión y sabio consejo, por ser mí fuerza, mi fortaleza, mi apoyo, mi inspiración y mi ejemplo de perseverancia y sacrificio.

A mis hermanos Víctor y Bryan, por ser mis amigos incondicionales, mis confidentes, por ser mi alegría y la luz de mi vida.

A mi abuelito Neptalí por ser el ángel que me cuida desde el cielo, y a mi abuelita Carmen por su cariño y sus consejos.

*Susana.*

## **AGRADECIMIENTO**

Al mi Dios todo poderoso por la vida, por haberme dado la salud, la sabiduría y las fuerzas necesarias para poder culminar mi carrera profesional y por permitirme disfrutar de mi familia que es mi mayor bendición.

A mis padres y hermanos por brindarme su amor incondicional, por inculcarme valores y estar siempre a mi lado en todo momento.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, a la Escuela de Bioquímica y Farmacia por acogerme y brindarme la formación necesaria, los valores de ética, para hacer de mí una excelente profesional y principalmente comprometida a trabajar por la sociedad.

A mis Docentes por impartirme los conocimientos necesarios a lo largo de mi formación académica.

Al Dr. Gerardo Medina director del trabajo de investigación y al Dr. Carlos Espinoza por su valiosa colaboración, gracias a ustedes por el apoyo incondicional, paciencia, ayuda, esfuerzo, conocimiento, tiempo y entrega que han empleado para que el presente trabajo tenga buenos resultados.

Al Ing. Francisco Toral, administrador del balneario, por haberme dado la oportunidad de realizar mi trabajo de investigación en el Balneario “Cununyacu”.

A la Dra. Aida Fierro por permitirme trabajar en el Laboratorio de Análisis Bioquímicos y Bacteriológicos y por aportar con sus conocimientos y orientación para la realización de mi trabajo de investigación.

A mis amigos por su amistad y apoyo durante el curso de mi formación académica.

Muchas gracias a todos.

Susana.

## TABLA DE CONTENIDOS

<b>RESUMEN</b> .....	<b>xxii</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>xxiii</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO I</b>	
<b>1. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>3</b>
<b>1.1 Agua</b> .....	<b>3</b>
<i>1.1.1. Propiedades del agua:</i> .....	<b>4</b>
<i>1.1.2. Funciones del agua.</i> .....	<b>4</b>
<b>1.2. Reseña histórica de las aguas termo- minerales</b> .....	<b>5</b>
<b>1.3. Aguas Minerales</b> .....	<b>6</b>
<i>1.3.1. Parámetros Físico-Químicos del agua</i> .....	<b>7</b>
<i>1.3.1.1. Temperatura</i> .....	<b>8</b>
<i>1.3.1.2. pH (Acidez)</i> .....	<b>8</b>
<i>1.3.1.3. Color</i> .....	<b>8</b>
<i>1.3.1.4. Olor</i> .....	<b>8</b>
<i>1.3.2. Clasificación de las aguas minerales</i> .....	<b>9</b>
<i>1.3.2.1. Dependiendo del origen</i> .....	<b>9</b>
<i>1.3.2.2. Dependiendo de los valores de temperatura</i> .....	<b>10</b>
<i>1.3.2.3. Dependiendo de los valores de pH</i> .....	<b>10</b>
<i>1.3.2.4. Dependiendo de los valores de residuos secos</i> .....	<b>11</b>
<i>1.3.2.5. Dependiendo de la Presión Osmótica</i> .....	<b>11</b>
<i>1.3.2.6. Dependiendo de los valores de Salinidad</i> .....	<b>11</b>
<i>1.3.3. Beneficios de Aguas minerales en relación a su composición química</i> .....	<b>13</b>
<i>1.3.4. Agua Termal</i> .....	<b>14</b>
<i>1.3.5. Origen de las aguas termales</i> .....	<b>15</b>
<i>1.3.6. Beneficios de las aguas termales</i> .....	<b>16</b>
<b>1.4. Balneario de Aguas Termales Cununyacu, Parroquia Tumbaco</b> .....	<b>16</b>

<b>1.4.1.</b>	<b><i>Parroquia Tumbaco</i></b> .....	<b>16</b>
<b>1.4.2.</b>	<b><i>Balneario Cununyacu</i></b> .....	<b>17</b>
<b>1.5.</b>	<b>Microorganismos</b> .....	<b>18</b>
<b>1.5.1.</b>	<b><i>Microbiología de las aguas termales</i></b> .....	<b>19</b>
<b>1.5.2.</b>	<b><i>Microorganismos autóctonos</i></b> .....	<b>19</b>
<b>1.6.</b>	<b>Análisis Microbiológico de las Aguas Termales</b> .....	<b>21</b>
<b>1.6.1.</b>	<b><i>Microorganismos Indicadores</i></b> .....	<b>21</b>
<b>1.6.2.</b>	<b><i>Coliformes totales</i></b> .....	<b>21</b>
<b>1.6.3.</b>	<b><i>Coliformes fecales</i></b> .....	<b>22</b>
<b>1.6.4.</b>	<b><i>Aerobios mesófilos</i></b> .....	<b>22</b>
<b>1.6.5.</b>	<b><i>Staphylococcus</i></b> .....	<b>22</b>
<b>1.6.6.</b>	<b><i>Hongos y levaduras</i></b> .....	<b>22</b>
<b>1.7.</b>	<b>Medios de cultivo</b> .....	<b>23</b>
<b>1.7.1.</b>	<b><i>Clasificación de los medios de cultivo según su consistencia</i></b> .....	<b>23</b>
<b>1.7.2.</b>	<b><i>Medios de cultivo según su utilización.</i></b> .....	<b>23</b>
<b>1.7.3.</b>	<b><i>Placas Petrifilm</i></b> .....	<b>24</b>
<b>1.7.3.1.</b>	<b><i>Las Placas Petrifilm™ para el Recuento de E.coli/Coliformes</i></b> .....	<b>25</b>
<b>1.7.3.2.</b>	<b><i>Las Placas Petrifilm™ para el Recuento de Staph Express</i></b> .....	<b>26</b>
<b>1.7.3.3.</b>	<b><i>Las Placas Petrifilm™ para el Recuento de Aerobios</i></b> .....	<b>26</b>
<b>1.7.3.4.</b>	<b><i>Las Placas Petrifilm™ para el Recuento Mohos y Levaduras</i></b> .....	<b>26</b>
<b>1.7.3.5.</b>	<b><i>Agar Mueller Hinton</i></b> .....	<b>26</b>
<b>1.7.3.6.</b>	<b><i>Agar Manitol Salado</i></b> .....	<b>27</b>
<b>1.7.3.7.</b>	<b><i>Agar Eosina Azul de Metileno</i></b> .....	<b>28</b>
<b>1.7.3.8.</b>	<b><i>Agar Sangre</i></b> .....	<b>28</b>
<b>1.7.3.9.</b>	<b><i>Agar MacConkey</i></b> .....	<b>29</b>
<b>1.7.3.10.</b>	<b><i>Agar Salmonella Shigella</i></b> .....	<b>30</b>
<b>1.8.1.</b>	<b><i>Morfología macroscópica de los microorganismos</i></b> .....	<b>32</b>
<b>1.8.2.</b>	<b><i>Coloración Gram, Bacterias Gram positivas y Gram negativas.</i></b> .....	<b>33</b>
<b>1.8.3.</b>	<b><i>Morfología microscópica de los microorganismos</i></b> .....	<b>34</b>

<b>1.9.</b>	<b>Pruebas Bioquímicas.....</b>	<b>35</b>
<i>1.9.1.</i>	<i>Prueba de la catalasa .....</i>	<i>35</i>
<i>1.9.2.</i>	<i>Prueba de la oxidase .....</i>	<i>35</i>
<i>1.9.3.</i>	<i>Prueba de la Coagulasa .....</i>	<i>36</i>
<i>1.9.4.</i>	<i>Prueba del NaCl 6,5 % .....</i>	<i>36</i>
<i>1.9.5.</i>	<i>Agar OF de Hugh y Leifson .....</i>	<i>36</i>
<i>1.9.6.</i>	<i>Agar Hierro de Kligler (KIA).....</i>	<i>37</i>
<i>1.9.7.</i>	<i>SIM (Sulfhídrico Indol Movilidad).....</i>	<i>37</i>
<i>1.9.8.</i>	<i>Citrato .....</i>	<i>38</i>
<i>1.9.9.</i>	<i>Reacción de la Ureasa .....</i>	<i>38</i>
<i>1.9.10.</i>	<i>Pruebas de sensibilidad de los Cocos Gram positivos. ....</i>	<i>38</i>
<i>1.9.11.</i>	<i>Hidrolisis del almidón .....</i>	<i>40</i>
<i>1.9.12.</i>	<i>Prueba de la Licuefacción de la Gelatina .....</i>	<i>41</i>
<b>1.10.</b>	<b>Antibiótico.....</b>	<b>41</b>
<i>1.10.1.</i>	<i>Clasificación de los antibióticos.....</i>	<i>41</i>
<b>1.11.</b>	<b>Resistencia antimicrobiana. ....</b>	<b>43</b>
<i>1.11.1</i>	<i>Causas de la resistencia antimicrobiana .....</i>	<i>43</i>
<i>1.11.2</i>	<i>Tipos de resistencia .....</i>	<i>44</i>
<i>1.11.3</i>	<i>Mecanismos de resistencia .....</i>	<i>44</i>
<b>1.12.</b>	<b>Antibiograma.....</b>	<b>45</b>
<i>1.12.1.</i>	<i>Disco para antibiograma.....</i>	<i>45</i>
<i>1.12.2.</i>	<i>Difusión en disco. ....</i>	<i>47</i>
<i>1.12.3</i>	<i>Medición de los halos de inhibición .....</i>	<i>47</i>
<b>1.13</b>	<b>Bacterias encontradas en el Estudio Microbiológico .....</b>	<b>48</b>
<b>CAPÍTULO II</b>		
<b>2.</b>	<b>MARCO METODOLÓGICO.....</b>	<b>50</b>
<b>2.1.</b>	<b>Parte experimental.....</b>	<b>50</b>
<b>2.2.</b>	<b>Lugar de muestreo .....</b>	<b>50</b>
<b>2.3.</b>	<b>Factores de Estudio .....</b>	<b>51</b>

<b>2.4.</b>	<b>Características del lugar de Investigación .....</b>	<b>51</b>
<b>2.5</b>	<b>Materiales.....</b>	<b>51</b>
<b>2.6.</b>	<b>Métodos .....</b>	<b>53</b>
<b>2.6.1.</b>	<b>Muestreo .....</b>	<b>53</b>
2.6.1.1.	<i>Toma de la muestra .....</i>	54
<b>2.6.2</b>	<b>Análisis Físico-Químico .....</b>	<b>54</b>
<b>2.6.3</b>	<b>Conservación y transporte de las muestras .....</b>	<b>54</b>
<b>2.6.4</b>	<b>Análisis Microbiológico .....</b>	<b>54</b>
2.6.4.1	<i>Siembra de microorganismos en placas Petrifilm3M PetrifilmTM .....</i>	55
2.6.4.2	<i>Técnica de Petrifilm™ según 3M™ 2009 .....</i>	55
2.6.4.3	<i>Siembra de microorganismos en cajas Petri de Eosina Azul de Metileno y Manitol Salado. ....</i>	56
<b>2.6.5.</b>	<b>Descripción macroscópica de las colonias .....</b>	<b>56</b>
2.6.6.1.	<i>Agar Mueller –Hinton, Sangre, Eosina Azul de Metileno, Manitol Salado, MacConkey, Salmonella shigella, Agar Almidón, Agra Gelatina.....</i>	57
2.6.6.2	<i>Preparación de Agar Kligler, SIM, Urea y citrato de Simmons .....</i>	58
2.6.6.3.	<i>Reactivo cloruro mercurico .....</i>	59
2.6.6.4.	<i>Agar Hugh- Leifson.....</i>	59
<b>2.6.7.</b>	<b>Estabilización del aislado bacteriano .....</b>	<b>59</b>
<b>2.6.8</b>	<b>Realización de repiques.....</b>	<b>60</b>
<b>2.6.9</b>	<b>Siembras por agotamiento para la obtención de cepas puras.....</b>	<b>60</b>
<b>2.6.10</b>	<b>Tinción Gram de las colonias que se obtuvieron por agotamiento. ....</b>	<b>61</b>
<b>2.6.11</b>	<b>Identificación bacteriana de las colonias aisladas.....</b>	<b>62</b>
2.6.11.1	<i>Método de la Prueba de Catalasa.....</i>	62
2.6.11.2	<i>Método de la Prueba de Oxidasa.....</i>	62
<b>2.6.12.</b>	<b>Identificación de Cocos Gram positivos .....</b>	<b>63</b>
2.6.12.1.	<i>Método de la Prueba de Coagulasa en plasma.....</i>	63
2.6.12.2.	<i>Método de la Prueba de NaCl 6,5% .....</i>	64
2.6.12.3.	<i>Método de siembra en Agar Manitol Salado .....</i>	65

2.6.12.4.	<i>Método de siembra en Agar Base Sangre</i> .....	65
<b>2.6.13</b>	<b><i>Prueba de sensibilidad a Cocos Gram positivos.</i></b> .....	<b>66</b>
<b>2.6.14</b>	<b><i>Identificación de Bacilos Gram Positivos.</i></b> .....	<b>67</b>
2.6.14.1	<i>Método de siembra en Agar Almidón.</i> .....	67
2.6.14.2	<i>Método de siembra en Agar Gelatina</i> .....	68
2.6.14.3	<i>Método de siembra en Agar E.M.B.</i> .....	69
2.6.14.4	<i>Método de siembra en Agar MacConkey</i> .....	70
2.6.14.5	<i>Método de siembra en Agar Salmonella Shigella</i> .....	70
2.6.14.6	<i>Método de inoculación en el Medio Hugh Leifson (O.F.)</i> .....	71
<b>2.6.15</b>	<b><i>Pruebas bioquímicas.</i></b> .....	<b>71</b>
2.6.15.1	<i>Método de inoculación en el Medio Kligler.</i> .....	72
2.6.15.2	<i>Método de inoculación en Urea</i> .....	73
2.6.15.3	<i>Método de inoculación en Citrato.</i> .....	74
2.6.15.4	<i>Medio SIM.</i> .....	75
<b>2.6.16.</b>	<b><i>Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana</i></b> .....	<b>76</b>
<b>CAPÍTULO III</b> .....		<b>79</b>
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIONES</b> .....	<b>79</b>
<b>3.1.</b>	<b>Resultado de la medición de los Parámetros In Situ</b> .....	<b>79</b>
<b>3.2.</b>	<b>Recuento de bacterias Aerobias Mesófilas</b> .....	<b>81</b>
<b>3.3.</b>	<b>Recuento de bacterias Coliformes fecales y totales</b> .....	<b>84</b>
<b>3.4.</b>	<b>Recuento de Staphylococcus aureus (UFC/mL)</b> .....	<b>86</b>
<b>3.5.</b>	<b>Recuento de Mohos y Levaduras</b> .....	<b>88</b>
<b>3.6.</b>	<b>Recuento de colonias en Agar Manitol Salado</b> .....	<b>92</b>
<b>3.7.</b>	<b>Recuento de colonias en Agar Eosina Azul de Metileno</b> .....	<b>92</b>
<b>3.8.</b>	<b>Número de clones aislados del Balneario “Cununyacu”</b> .....	<b>93</b>
<b>3.9.</b>	<b>Morfología macroscópica de las colonias bacterianas puras obtenidas en las aguas termales del balneario “Cununyacu”</b> .....	<b>96</b>
<b>3. 10.</b>	<b>Resultados de las pruebas bioquímicas de los clones aislados</b> .....	<b>98</b>
<b>3.11.</b>	<b>Especies bacterianas identificadas del Balneario “Cununyacu”</b> .....	<b>102</b>

<b>3.12. Susceptibilidad de los clones aislados de las aguas termales del balneario</b>	
<b>“Cununyacu” frente a diversos antibióticos. ....</b>	<b>105</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>115</b>
<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>118</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<b>KIA</b>	Agar Hierro de Kligler
<b>CMI</b>	Concentración Mínima Inhibitoria
<b>°C</b>	Grados Celsius
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de Hidrogeno
<b>INAMHI</b>	Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología
<b>mg/mL</b>	Miligramo por mililitro
<b>mm</b>	Milímetro
<b>%</b>	Porcentaje
<b>pH</b>	Potencial de hidrógeno
<b>STD</b>	Sólidos Totales Disueltos
<b>SIM</b>	Sulfhídrico Indol Movilidad
<b>UFC/mL</b>	Unidades Formadoras de Colonias por mililitro
<b>Cal</b>	Calorías
<b>Pa</b>	Presión atmosférica
<b>m.s.n.m</b>	Metros sobre el nivel del mar
<b>H<sub>2</sub>S</b>	Gas sulfhídrico
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Agua
<b>µg ó mcg</b>	Microgramos
<b>µg/mL</b>	Microgramos por mililitro
<b>µL</b>	Microlitro
<b>µm</b>	Micrómetro
<b>µs/cm</b>	Microsiemens por centímetro
<b>mg/L</b>	Miligramo por litro
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>OF</b>	Óxido-Fermentación
<b>r/min</b>	Revoluciones por minuto
<b>BHI</b>	Caldo-Infusión Cerebro-Corazón
<b>CMI</b>	Concentración Mínima Inhibitoria

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1-3.</b>	Resultado de la determinación de los parámetros in-situ de las aguas termales del Balneario “Cununyacu” Primer muestreo.....	79
<b>Tabla 2-3.</b>	Resultado de la determinación de los parámetros in-situ de las aguas termales del Balneario “Cununyacu” (Segundo muestreo).....	79
<b>Tabla 3-3.</b>	Recuento de bacterias Aerobias Mesófilas (UFC/mL) de las aguas termales del Balneario “Cununyacu”.....	81
<b>Tabla 4-3.</b>	Resultado del recuento de <i>Escherichia coli</i> /coliformes (UFC/mL) de las aguas termales del Balneario “Cununyacu”.....	84
<b>Tabla 5-3.</b>	Resultado del recuento de bacterias <i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/mL) de las aguas termales del Balneario “Cununyacu”.....	87
<b>Tabla 6-3.</b>	Resultado del recuento de Mohos y Levaduras (UFC/mL) de las aguas termales del Balneario “Cununyacu”.....	89
<b>Tabla 7-3.</b>	Resultado del recuento de colonias en la Placa Petri Manitol Salado (UFC/mL) de las aguas termales del Balneario “Cununyacu”.....	92
<b>Tabla 8-3.</b>	Resultado del recuento de colonias en la Placa Petri Eosina Azul de Metileno (UFC/mL) de las aguas termales del Balneario “Cununyacu”.	92
<b>Tabla 9-3.</b>	Número de clones aislados del Balneario “Cununyacu”.....	93
<b>Tabla 10-3.</b>	Características macroscópicas de las colonias puras obtenidas en las aguas termales del Balneario “Cununyacu”.....	96
<b>Tabla 11-3.</b>	Numero de clones puros seleccionados para su caracterización e identificación.....	97
<b>Tabla 12-3.</b>	Pruebas bioquímicas de clones aislados (cocos Gram positivos) de las aguas Termales del Balneario “Cununyacu”.....	98
<b>Tabla 13-3.</b>	Pruebas bioquímicas del clon aislado (bacilos Gram positivo) de las aguas Termales del Balneario “Cununyacu”.....	100
<b>Tabla 14-3.</b>	Pruebas bioquímicas de clones aislados (bacilos Gram negativos) de las aguas Termales del Balneario “Cununyacu”.....	101
<b>Tabla 15-3.</b>	Especie de Bacterias identificadas de las Aguas Termales del Balneario “Cununyacu”.....	102
<b>Tabla 16-3</b>	Bacterias encontradas en cada sitio muestreado del Balneario “Cununyacu”.....	105
<b>Tabla 17-3.</b>	Antibiograma de Cocos Gram positivos de las aguas termales del	106

	Balneario “Cununyacu” .....	
<b>Tabla 18-3.</b>	Antibiograma del Bacilo Gram positivos de las aguas termales del Balneario “Cununyacu” .....	109
<b>Tabla 19-3.</b>	Antibiograma de los Bacilos Gram negativos de las aguas termales del Balneario “Cununyacu” .....	110

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1-1</b>	Clasificación dependiendo de la temperatura.....	10
<b>Cuadro 2-1</b>	Clasificación dependiendo del pH según la Norma Cubana.....	10
<b>Cuadro 3-1</b>	Clasificación según su composición físico química.....	12
<b>Cuadro 4-1.</b>	Beneficios de Aguas minerales en relación a su composición química	13
<b>Cuadro 5-1</b>	Crecimiento de Microorganismos en Agar Eosina Azul de Metileno..	28
<b>Cuadro 6-1</b>	Aspecto de crecimiento de Microorganismos en Agar MacConkey...	30
<b>Cuadro 7-1</b>	Aspecto de crecimiento de Microorganismos en Agar <i>Salmonella</i> <i>Shigella</i> .....	31
<b>Cuadro 8-1.</b>	Características morfológicas de las bacterias.....	32
<b>Cuadro 9-1</b>	Géneros de las bacterias con sus características.....	48
<b>Cuadro 1-2</b>	Materiales de laboratorio.....	51
<b>Cuadro 2-2</b>	Equipos de laboratorio.....	52
<b>Cuadro 3-2</b>	Reactivos.....	52
<b>Cuadro 4-2</b>	Medio de cultivo.....	53
<b>Cuadro 5-2</b>	Características macroscópicas de aislados bacterianos.....	57

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Grafico 1-3</b>	Porcentaje del recuento de Aerobios Mesófilos (UFC/mL) de las Aguas Termales del Balneario “Cununyacu”.....	83
<b>Grafico 2-3</b>	Recuento de <i>Escherichia coli</i> / coliformes (UFC/mL) de las Aguas Termales del Balneario “Cununyacu”.....	85
<b>Grafico 3-3</b>	Recuento de bacterias <i>Staphylococcus</i> (UFC/mL) de las aguas termales del Balneario “Cununyacu”.....	88
<b>Grafico 4-3</b>	Recuento de Mohos y Levaduras (UFC/mL) de las aguas termales del Balneario “Cununyacu”.....	90
<b>Grafico 5-3</b>	Porcentaje de Bacilos y Cocos Gram negativos, Bacilos y Cocos Gram positivos.....	94

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1-1</b>	Estructura molecular del agua.....	3
<b>Figura 2-1</b>	Origen de las aguas termominerales.....	15
<b>Figura 3-1</b>	Mapa de ubicación de la Parroquia Tumbaco.....	16
<b>Figura 4-1</b>	Mapa de ubicación del Balneario “Cununyacu” (Tumbaco-Pichincha)..	17
<b>Figura 5-1</b>	Árbol filogenético universal. Dominios: Bacteria, Archaea y Eucarya...	18
<b>Figura 6-1</b>	Placas Petrifilm.....	24
<b>Figura 7-1</b>	Ejemplo de burbujas asociada con las colonias productoras de gas.....	25
<b>Figura 8-1</b>	Agar Mueller Hinton.....	27
<b>Figura 9-1</b>	Agar Manitol Salado.....	27
<b>Figura 10-1</b>	Agar Eosina Azul de Metileno.....	28
<b>Figura 11-1</b>	Patrones de Hemólisis .....	29
<b>Figura 12-1</b>	Agar MacConkey.....	30
<b>Figura 13-1</b>	Agar <i>Salmonella Shigella</i> .....	31
<b>Figura 14-1</b>	Diagrama de la pared bacteriana Gram positiva y Gram negativa.....	33
<b>Figura 15-1</b>	Morfología. y estructura bacteriana.....	34
<b>Figura 16-1</b>	Agar Hugh Leifson.....	37
<b>Figura 17-1</b>	Sensibilidad a la Bacitracina.....	39
<b>Figura 18-1</b>	Sensibilidad a la Novobiocina .....	39
<b>Figura 19-1</b>	Sensibilidad a la Optoquina.....	40
<b>Figura 20-1</b>	Discos para Gram positivos y Gram negativos usados en el antibiograma.....	47
<b>Figura 21-1</b>	Antibiograma por difusión con disco.....	49
<b>Figura 1-2</b>	Puntos de muestreo en el Balneario “Cununyacu”.....	50
<b>Figura 2-2</b>	Morfología de las colonias bacterianas.....	57
<b>Figura 3-2</b>	Siembra por agotamiento.....	60
<b>Figura 4-2</b>	Tinción Gram, observación en el microscopio.....	61
<b>Figura 5-2</b>	Prueba Bioquímica de la Catalasa.....	62
<b>Figura 6-2</b>	Prueba Bioquímica de la Oxidasa.....	63
<b>Figura 7-2</b>	Prueba Bioquímica de la Coagulasa.....	64
<b>Figura 8-2</b>	Fermentación de Agar Manitol.....	65
<b>Figura 9-2</b>	Hemólisis en Agar Sangre.....	66
<b>Figura 10-2</b>	Prueba Hidrólisis del Almidón.....	68
<b>Figura 11-2</b>	Prueba Hidrólisis de Gelatina.....	69

<b>Figura 12-2</b>	Crecimiento en Eosina Azul de Metileno.....	69
<b>Figura 13-2</b>	Crecimiento en Agar MacConkey.....	70
<b>Figura 14-2</b>	Crecimiento de colonias en Agar Salmonella Shigella.....	71
<b>Figura 15-2</b>	Prueba de Hugh y Leifson.....	72
<b>Figura 16-2</b>	Prueba Bioquímica en Agar hierro de Kligler (KIA).....	73
<b>Figura 17-2</b>	Prueba Bioquímica en agar Urea.....	74
<b>Figura 18-2</b>	Prueba Bioquímica en Agar Citrato.....	75
<b>Figura 19-2</b>	Prueba Bioquímica SIM (Indol, Movilidad, H <sub>2</sub> S).....	76
<b>Figura 20-2</b>	Método de difusión en Agar Mueller Hinton.....	77

## ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

<b>Fotografía 1-2</b>	Prueba de sensibilidad a Cocos Gram Positivos.....	67
-----------------------	--	----

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>ANEXO A</b>	<b>Balneario de aguas Termales “Cununyacu”</b>
<b>ANEXO B</b>	Puntos de la toma de muestra para el Estudio Microbiológico.
<b>ANEXO C</b>	Medición de los parámetros in-situ.
<b>ANEXO D</b>	Recolección de la Muestra.
<b>ANEXO E</b>	Siembra por el método de Petrifilm en las muestras A, B, C, D y E
<b>ANEXO F</b>	Resultados del recuento de bacterias de los sitios A, B, C, D y E, a las 24 horas, a una temperatura de 35°C. (Primer muestreo)
<b>ANEXO G</b>	Resultados del recuento de bacterias de los sitios A, B, C, D y E, a las 24 horas, a una temperatura de 35°C. (Segundo muestreo)
<b>ANEXO H</b>	Realización de repiques.
<b>ANEXO I</b>	Realización de la Tinción Gram.
<b>ANEXO J</b>	Prueba de la catalasa y oxidasa a clones aislados
<b>ANEXO K</b>	Prueba de identificación para Cocos Gram positivos
<b>ANEXO L</b>	Prueba de identificación para Bacilos Gram positivos
<b>ANEXO M</b>	Prueba de identificación para Bacilos Gram negativos
<b>ANEXO N</b>	Antibiogramas de las especies identificadas.

## RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue identificar la microbiota autóctona y alóctona presente en las aguas termales del Balneario “Cununyacu”, ubicado en la Provincia de Pichincha, y a la vez determinar que microorganismos pondrían en riesgo la salud de los usuarios que visitan el balneario. Se realizó un análisis físico-químico para determinar la temperatura y el pH, el análisis microbiológicos se llevó a cabo mediante la técnica de siembra en placas Petrifilm para bacterias coliformes /*Escherichia coli*, aerobias mesófilas, *Staphylococcus aureus*, mohos y levaduras. Posteriormente se realizó la purificación de las bacterias mediante un aislamiento para la obtención de clones puros, los mismos fueron sometidos a coloración Gram la cual ayudó a identificar las bacterias Gram positivas, Gram negativas y las pruebas que se realizarían a cada grupo. Se logró aislar 180 clones, de los cuales 52% fueron cocos positivos y 43 % bacilos negativos, se escogieron 22 clones que fueron identificados mediante el empleo de diversas pruebas bioquímicas, las especies encontradas fueron: *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus viridans*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus spp*, *Bacillus spp*, *Alcaligenes faecalis*, *Brevundimonas diminuta*, *Aeromonas schubertii*. Sobre los 22 clones identificados se realizó el antibiograma por el método de difusión en agar, observándose que la mayoría de los aislados bacterianos fueron resistentes a los antibióticos utilizados. Se constató que en las aguas termales del balneario existe una población bacteriana diversa, en la que algunos forman parte de la población autóctona y otros se encuentran en el suelo, plantas y aguas superficiales y desde estos hábitats pueden llegar al agua termal. Se recomienda que los responsables del balneario realicen acciones correspondientes para determinar la causa de la contaminación que presenta el balneario y realizar estudios periódicos para evaluar la calidad de agua y evitar riesgos en la salud de los usuarios.

**PALABRAS CLAVE:** <TECNOLOGÍA Y CIENCIAS DE LA INGENIERÍA>, <BIOQUÍMICA>, <MICROBIOLOGÍA>, <AGUAS TERMALES> <PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS>, <MICROBIOTA AUTÓCTONA>, <CLONES PUROS>, <ANTIBIOGRAMA>, <INDICADORES BACTERIANOS>.

## SUMMARY

The aim of this study was to identify the present indigenous and alóctona microbiota in the hot springs spa “Cununyacu” located in the province of Pichincha, and at the same time determine which microorganism could endanger the health of users visiting the spa. A physico-chemical analysis was performed to determine the temperature and pH, microbiological analysis was carried out by plating Petrifilm technique for Coliform Bacteria / Escherichia Coli, mesophilic aerobic, *Staphylococcus aureus*, fungi and yeasts. Subsequently, the purification of the bacteria was performed using an isolated to obtain pure clones, which subjected to Gram coloration, which helped to identify Gram positive, Gram negative bacteria and testing to perform each bacteria group. It was isolated 180 clones, of which 52% were positive coconuts and 43% of negative bacilli, 22 clones were chosen that were identified by using various biochemical tests, the species found were: *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus viridans*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus spp*, *Bacillus spp*, *Alcaligenes faecalis*, *Brevundimonas diminuta*, *Aeromonas schubertii*. Over the 22 clones identified were performed by the agar diffusion method, nothing that most of the bacterial isolates were resistant to the antibiotics used. It was found that in the hot springs spa there are diverse bacterial population, in which some of them form part of the indigenous population and other are in the soil, plants and surface water and from these habitats it can reach the thermal water. It is recommended that those responsible for the spa perform corresponding action to determine the cause of the pollution that this spa has and conduct periodic studies to assess water quality and prevent health risks to users.

**KEYWORDS:** <TECHNOLOGY AND ENGINEERING SCIENCES>, <BIOCHEMISTRY>, <MICROBIOLOGY>, <HOT SPRINGS> <PHYSICAL-CHEMICAL PARAMETERS>, <INDIGENOUS MICROBIOTA>, <PURE CLONES>, <ANTIBIOGRAM>, <BACTERIAL INDICATORS>

## INTRODUCCIÓN

Las aguas termales son ambientes extremos, a consecuencia de sus altas temperaturas y elevadas concentraciones minerales condiciones desfavorables para la vida de muchos microorganismos, sin embargo se ha descrito que este hábitat contiene una microbiota autóctona estrechamente relacionada con características tales como composición mineral y pH del manantial, además está presente la microbiota alóctona proveniente del medio ambiente que rodea el manantial. (BORJA J et al., 2012. p. 66)

Se denomina agua termal a aquellas aguas subterráneas que en el punto donde emergen poseen una temperatura por lo menos 5 °C superior a la temperatura ambiental, pudiendo alcanzar temperaturas sobre los 90 °C al momento de emerger. (BURBANO N et al., 2013. p 6)

La forma más antigua de tratamiento de las enfermedades ha sido la utilización de las aguas termales, pues hace más de 4000 años que empezaron a aplicarse en forma de baños o por vía oral gracias a sus propiedades terapéuticas. (DE LA ROSA & MOSSO, 2004)

Debido a que el Ecuador está ubicado geográficamente dentro del llamado Cinturón de Fuego del Pacífico, sus cuatro regiones Costa, Sierra, Oriente y Galápagos, cuentan con actividad volcánica, esto hace que la fuerte actividad magmática generadas por la corteza terrestre permita que la temperatura del agua que circula a grandes profundidades aumente provocando que en la superficie se manifieste como aguas calientes. Este fenómeno natural convierte al país en uno de los mejores lugares existentes en el mundo para relajarse en un baño termal de aguas ricas en minerales. (Hopey, 2013. <http://www.ecuadorexplorer.com/es/html/aguas-termales-y-spas.html>)

Desde tiempos pasados se le ha atribuido a las aguas termominerales propiedades curativas y relajantes, esto ha hecho que la hidrología en la medicina sea muy conocida ya que sus aguas ricas en minerales, nutrientes y sulfuros son útiles para el tratamiento de enfermedades. (INAMHI, 2013, p.5)

En la parroquia Tumbaco perteneciente a la provincia de Pichincha, existe un sinnúmero de aguas termales a las cuales se les atribuyen propiedades beneficiosas para la salud. Es por ello que surge la necesidad e interés de realizar estudios microbiológicos del agua, que nos ayudara a tener conocimiento de los microorganismos autóctonos y alóctonos presentes en el agua, y por ende de la calidad microbiológica de las mismas.

En la bibliografía se reportan diversos estudios realizados a nivel mundial sobre las aguas termominerales, lo cual nos indica la importancia y la calidad que tienen. Estos estudios ayudan a comprender las características fisicoquímicas, microbiológicas y ambientales de las aguas termominerales las cuales son usadas por un gran número de personas todos los días.

El presente trabajo se centra en el estudio microbiológico de las aguas termales del Balneario Cununyacu el cual se encuentra ubicado en la parroquia Tumbaco perteneciente a la provincia de Pichincha, con la finalidad de identificar la diversidad microbiana presente en el balneario que pudiera perjudicar la salud de los usuarios, ya que las mismas son usadas por los beneficios que brindan.

La importancia de realizar el estudio microbiológicos que permitan determinar si existe la presencia de microorganismos patógenos, se debe a que el balneario Cununyacu no cuenta con la infraestructura adecuada, encontrándose al aire libre, corriendo el riesgo de que sus aguas estén expuestas a contaminación por factores externos como por ejemplo las heces de los animales que habitan el lugar, los microorganismos presentes en el agua y los propios usuarios que podrían acarrear consigo microorganismos y depositarlos en el agua al momento de ingresar.

Un motivo más para la realización de estos estudios en los balnearios de aguas termales es el de poner en práctica lo que dice la constitución de nuestro país que se basa en el Plan Nacional del Buen Vivir, en donde se reconoce el derecho de todas las personas de vivir en un ambiente sano y ecológicamente equilibrado.

Al caracterizar la microbiota del balneario aumentara y mejorara el uso de este medio natural, además de ser una herramienta importante de nuestros saberes ancestrales. Estas investigaciones serán el principio para que otros investigadores profundicen más sobre el tema ya que de encontrarse microorganismos que no conocemos se podrán analizar sus actividades enzimáticas y encontrar en ellos un sinnúmero de aplicaciones a nivel industrial y comercial.

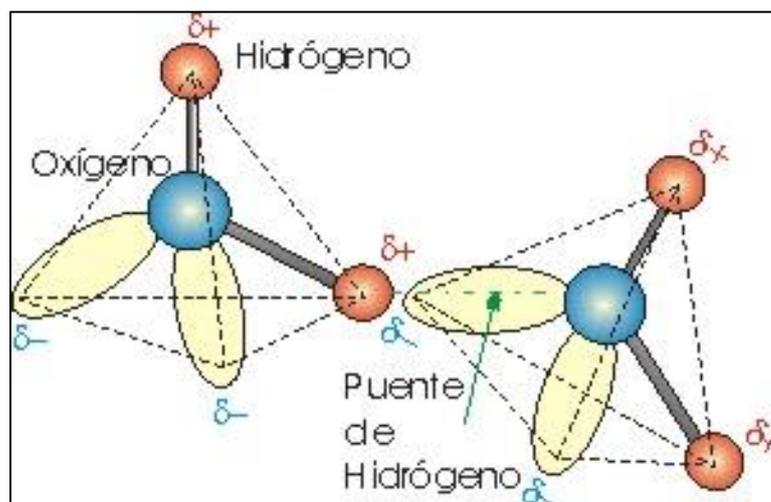
# CAPÍTULO I

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1 Agua

El agua es una sustancia vital que tiene excepcionales propiedades debido a su estructura y composición. Es una molécula sencilla que está constituida por dos átomos de hidrógeno y uno de oxígeno, forman puentes de hidrogeno entre sus moléculas adyacentes debido a sus enlaces polares. Los enlaces polares tienen gran importancia ya que brinda al agua propiedades que se corresponden con mayor masa molecular, produciendo puntos de fusión y ebullición altos, imprescindibles para que el agua se conserve en estado líquido a la temperatura de la tierra. (CARBAJAL, Ángeles.; GONZALES, María, 2012,p. 63)

La cantidad existente de agua se distribuye en los océanos que tienen la gran mayoría de esta sustancia 97.13%, los glaciales y casquetes polares contienen 2.24 %, agua subterránea 0.61% y los ríos, lagos y corrientes constituyen tan solo al 0.02%. (Snoeyink V y Jenkins D, 1990: p. 15)



**Figura 1-1:** Estructura molecular del agua.

Fuente: Valdez T. 20012

### ***1.1.1. Propiedades del agua:***

- **Disolvente.-** Es el líquido que disuelve una gran cantidad de sustancias, esta importante propiedad se le atribuye a la formación de puentes de hidrogeno, y se le conoce como el disolvente universal. Los dipolos del agua atraen los iones de las sales en las disoluciones iónicas y quedan atrapados por moléculas formando iones solvatados o hidratados.
- **Fuerza de cohesión.-** las moléculas de agua se mantienen unidas debido a sus puentes de hidrogeno, y convirtiéndola en un líquido incompresible esto ayuda en algunos animales a formar un esqueleto hidrostático.
- **Calor específico.-** Se relaciona con los puentes de hidrógeno, el agua puede absorber calor y esto rompe los puentes de hidrogeno por ello la temperatura se eleva. El citoplasma acuoso es útil para proteger de los cambios de temperatura manteniendo la temperatura constante.
- **Calor de vaporización.** Los puentes de hidrogeno son los responsables de la vaporización del agua, lo que ocurre es el rompimiento de los puentes de hidrogeno y dotan a las moléculas de agua de energía cinética que le permite al agua pasar de la fase líquida a la gaseosa. Se necesita 1 Pa, 540 cal y temperatura de 20 °C para evaporar 1 g. de agua. (Snoeyink V y Jenkins D, 1990: p. 15)

### ***1.1.2. Funciones del agua.***

- El agua presente en nuestro cuerpo forma el medio acuoso en donde tienen lugar los procesos metabólicos que ocurren en nuestro organismo, esto es posible gracias a que las enzimas necesitan de un medio acuoso que permita que su estructura tridimensional adopte su forma activa.
- Gracias a la evaporación del agua se regula la temperatura por medio del sudor o de las mucosas, es decir ayuda a regular la temperatura de nuestro cuerpo mediante la evaporación de agua a través de la piel.
- El agua ayuda a transportar nutrientes a las células y eliminar desechos desde las células, además es la encargada de retirar los desechos producidos por el metabolismo celular de nuestro cuerpo.
- Es capaz de actuar como reactivo en reacciones de metabolismo, aportando hidrogeniones ( $H_3O^+$ ) o hidroxilos ( $OH^-$ ) al medio. (CARBAJAL, Ángeles.; GONZALES, María, 2012)

## **1.2. Reseña histórica de las aguas termo- minerales**

Las leyendas antiguas cuentan que los animales fueron los primeros que descubrieron las propiedades medicinales de las aguas termales, ya que ellos acudían a los manantiales a curar las heridas de sus alas o patas, de esta manera los seres humanos aprendieron a apreciar los dones que brindaba la naturaleza, ya que en esos tiempos no existía medicamentos adecuados para las diferentes enfermedades. (FAGUNDO, J., 2000, pp. 3- 4)

Se consideran que los primeros balnearios de aguas mineromedicinales datan de hace 2000 a. C. y que el hombre primitivo de la edad de piedra ya conocía los beneficios a la salud que brindan, existe evidencias de que en esas épocas ya existía los balnearios en la ciudad de India de Mojenjo-Daro que era una ciudad de la antigua cultura del valle del Indo en Pakistán y en la ciudad de Epidauros una pequeña ciudad griega de la Argólida ubicada al noreste de Peloponso, además han aparecido instalaciones en la isla griega de Creta (entre 1700 y 1400 a.C.) y en la ciudad Egipcia de Tel el-Amarna (1360 a.C.) (FAGUNDO, J., 2000, pp. 3- 4)

Algunos centros médicos griegos como los de Peloponeso, Cos, Pérgamo y otros disponían de manantiales que proporcionaban técnicas hidroterapéuticas. (FAGUNDO, J., 2000, pp. 3- 4)

En esa época se alcanzó un gran desarrollo en la medicina ya que se aspiraban en Asclepio Dios griego de la medicina que tenía el don de la curación y conocía muy bien la vegetación y las plantas medicinales. A finales de siglo V a C. en Grecia y en Roma los baños en aguas termales se acompañaban de ejercicios y masajes. En el siglo II a.C. se crearon en Roma muchas termas públicas, estos hábitos llegaron hasta Europa con lo cual se difundió las prácticas y uso de las aguas termales como curas balnearias. (FAGUNDO, J., 2000, pp. 3- 4)

Cuando los árabes invadieron el Sur de Europa, las curas termales y los baños públicos se integraron, disponiendo a las ciudades más importantes de por lo menos un baño de agua termal uno de ellos fue El Baño Real de la Alambra en Granada. Cuando los reyes católicos volvieron a reconquistar España, las prácticas de curas balnearias se dejaron a un lado ya que se relacionaban con actos herejes y moriscos. (FAGUNDO, J., 2000, pp. 3- 4)

En Constantinopla, ciudad actualmente llamada Estambul en Turquía, se mantuvieron las costumbres romanas y se reforzaron durante el dominio turco.

Las cruzadas entre los años 1099 y 1291 también dieron gran importancia a las curas termales ya que se usaban para la cura de los heridos y combatir enfermedades. En el siglo XV los avances de la balneoterapia no fueron significativos, a pesar de los beneficios que brindaba a la medicina, sin embargo los pobladores del Nuevo Mundo empezaron a usar las aguas por las propiedades benéficas que estas tenían. En los siglos VIII y XIX se generaliza la costumbre del uso del agua termal como medida de higiene, sin embargo por la aglomeración de las personas en el siglo XX apareció la enfermedad del cólera, lo cual obligo a los habitantes a construir baños privados. (FAGUNDO, J., 2000, pp. 3- 4)

En 1986 las aguas termales fueron declaradas como una arma para gozar de buena salud física y mental, por ello surgió una disciplina, la hidrología médica que es el uso del agua como agente terapéutico, siendo aceptada como medicina complementaria por la Organización Mundial de la Salud. (FAGUNDO, J., 2000, pp. 3- 4)

Actualmente ya es conocido los beneficios que tienen las aguas termales, su composición química, sus orígenes. Sin embargo las curas hidrotermales ya no tienen la misma importancia que tenían en otras épocas, lo cual es debido al desarrollo de la Medicina. (FAGUNDO, J., 2000, pp. 3- 4)

### **1.3. Aguas Minerales**

Se define como agua termal, a las aguas que surgen del suelo pero que no tienen contaminación debido a sus componentes químicos, gases disueltos y/o por sus características físico-químicas. Estas aguas son susceptibles de aplicaciones dietéticas y de producir acciones fisiológicas en el organismo.

- Según la OMS en 1969 se considera aguas minerales a las aguas que no están contaminadas y que proceden de fuentes subterráneas y con una mineralización de 1g por cada L de agua o 250 mg de CO<sub>2</sub> libre. (FLORES, Sandra. 2013. p. 5)
- Según Cadish (1964, en Urbani, 1991), un agua mineral es aquella que posee un residuo seco superior a 1g/L, o sin tener la cantidad de residuo tenga más de 1 mg/L de litio, 5 mg/L de hierro, 5 mg/L de estroncio, 1 mg/L de yodo, 2 mg/L de flúor, 1,2 mg/L de sílice, etc. (FAGUNDO et al., 2004: p. 4)

Son distintas las definiciones que se usa para referirse a las aguas minerales y relacionarlos con los minerales que poseen disueltos, tomando en cuenta además de su caudal, temperatura y composición química y bacteriológica, su acción terapéutica. (FLORES, Sandra. 2013. p. 5)

- Aguas termo-minerales: son aguas termales que contienen un total de sólidos disueltos superior a 1g/L. (FLORES, Sandra. 2013. p. 5)
- Aguas mineral medicinal: agua que por la composición que posee puede utilizarse con fines terapéuticos, desde el lugar que emerge hasta el lugar donde sea usado, ya que al poseer sales minerales disueltas o en suspensión tienen propiedades curativas, beneficiosas para la salud humana. (LLOPIS, María del Mar. 2013. p. 161)
- Según la NORMA INEN 2178 El agua mineral natural se identifica por tener en su composición minerales, oligominerales y por su pureza natural, puede provenir de fuentes subterráneas que proceden de acuíferos o de fuentes naturales. (INEN, 2011, p.8)
- Agua mineral natural carbonatada. Es aquella que contienen gas carbónico, la misma proveniente de la fuente la cual después de pasar por un tratamiento ha sido eliminado. (INEN, 2011, p.8)
- Agua mineral natural no carbonatada. Es aquella que no libera gas carbono el momento de salir de la fuente. (INEN, 2011, p.8)
- Agua mineral reforzada con gas de la fuente. Es agua con efervescencia, la cual proviene de la fuente, es eliminada después de realizado un tratamiento. (INEN, 2011, p.8)
- Agua mineral natural con adición de gas carbónico. Agua a la cual se le adiciona efervescencia añadiendo el gas carbónico que provienen de origen diferente a la fuente. (INEN, 1982, p.8)
- Agua de manantial. Se la considera a aquella que emerge a la superficie de la tierra de forma espontánea y con un determinado caudal, el agua de manantial no posee las propiedades del agua mineral. (FAGUNDO, J., 2000, p. 3)

### ***1.3.1. Parámetros Físico-Químicos del agua***

Los parámetros físico-químicos son importantes ya que de ellos depende la estética y aceptabilidad del agua, además porque impresionan los sentidos (olfato, vista).

#### *1.3.1.1. Temperatura*

Considerado como uno de los más importantes parámetros que tiene el agua, ya que es capaz de acelerar o retardar la actividad biológica, la participación de compuestos, la absorción de oxígeno, procesos de mezcla, floculación, sedimentación y filtración. Pueden existir muchos factores principalmente ambientales que provocan la variabilidad de la temperatura del agua. La temperatura se determina mediante termometría realizada “in situ”. (AZNAR, A. 2000, p. 3-8)

#### *1.3.1.2. pH (Acidez)*

La acidez es una medida de la concentración de iones ( $H_3O^+$ ) en la disolución. Las aguas que tienen valores de pH inferiores a 7 son ácidas y ayudan a la corrosión de las piezas metálicas, las aguas que poseen valores de pH superiores a 7 son básicas produciendo la precipitación de sales insolubles. El pH de las aguas tanto crudas como tratadas debería estar entre 5,0 y 9,0. Por lo general, este rango permite controlar sus efectos en el comportamiento de otros constituyentes del agua. (AZNAR, A. 2000, p. 3-8)

#### *1.3.1.3. Color*

El color no tiene nada que ver con el grado de contaminación de las aguas, ya que existe interferencia con otras sustancias coloreadas que pueden influir en el color, dificultando la evaluación, es por ello que el color se evalúa en las veinte y cuatro horas posteriores a la toma de muestra. El color se determina visualmente sobre un fondo blanco y con ayuda de luz diurna. El color del agua verdadero es decir agua sin sólidos en suspensión o aparente (agua bruta). (AZNAR, A. 2000, pp. 3-8)

#### *1.3.1.4. Olor*

Los olores pueden ser provocados por sustancias volátiles o gaseosas y puede ser causado por productos químicos, materia orgánica en descomposición o sustancias propias de la tierra. (AZNAR, A. 2000, p. 3)

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

La clasificación de las aguas termales y minerales se asumen desde algunos puntos de vista como: su origen, su temperatura, su composición química, etc.

#### *1.3.2.1. Dependiendo del origen*

##### *Origen Geológico – genético*

Dependiendo de su origen las podemos clasificar en:

- Agua magmáticas son primitivas, nacen de filones eruptivos o metálicos, la temperatura es elevada generalmente superior a 50°C, cuenta con un caudal constante, periódico y rítmico y también mantienen una temperatura y composición constante. La presencia de elementos producidos por emanaciones metálicas es característica, como fósforo, boro, arsénico, cobre, bromo, nitrógeno.
- Agua telúricas, también conocidas como de infiltración pueden nacer de cualquier terreno. Según sea el régimen de estación del año el caudal puede variar. La temperatura de las aguas telúricas pocas veces llegan a los 50 °C, la concentración de minerales que presenta es inversamente proporcional al caudal que presenta, su mineralización va de mediano a bajo. En estas aguas están presentes sales de magnesio, calcio, cloruros, bicarbonatos, etc.
- Agua Meteórica: La cual forma parte del ciclo hidrológico ya que es subterránea.
- Agua Metamórfica: Se denomina así porque durante su metamorfosis se mantiene en contacto con rocas.
- Agua Congénita: durante largos periodos de tiempo, no está en contacto con la atmosfera.
- Agua Juvenil: la que no ha estado ni en contacto ni formando parte de la atmosfera. (BURBANO N et al., 2013. p 4)

### 1.3.2.2. Dependiendo de los valores de temperatura

Para determinar la temperatura del agua termal es necesario medir el mismo en el origen de donde emerge el agua y es expresado en °C.

Según Schoeller (1962), para clasificar el agua según su temperatura se considera la temperatura media anual del aire (Tma) o la temperatura del suelo (Ts).

**Cuadro 1-1:** Clasificación dependiendo de la temperatura.

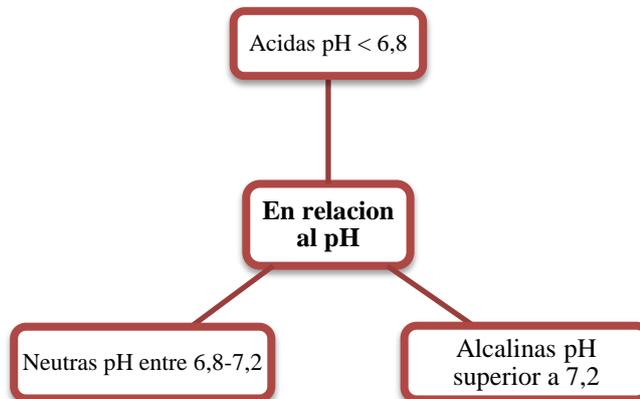


Fuente: (FAGUNDO J. et al., 2004. p.5)

### 1.2.3.3. Dependiendo de los valores de pH.

De acuerdo a la norma Cubana de Agua Mineral (CN 93-01-218-1995) se clasifican en:

**Cuadro 2-1:** Clasificación dependiendo del pH según la Norma Cubana.



Fuente: (FAGUNDO, 2004.p 5)

#### 1.2.3.4. *Dependiendo de los valores de residuos secos*

- Oligometalicos: no superior a 100mg/l
- De mineralización muy débil: entre 100 y 250mg/l
- De mineralización débil: entre 250 y 500 mg/l
- De mineralización media: entre 500y 1000mg/l
- De mineralización fuerte: superior a 1000mg/l (MARAVER, F et al., 2003. P.16)

#### 1.2.3.5. *Dependiendo de la Presión Osmótica*

Se relación con la cantidad de iones disueltos en mili moles, el agua que tiene una concentración molar de 303 mmol/L, posee una presión similar al suero sanguíneo.

- ♦ **Hipotónicas:** Concentraciones < 300mmol/L
- ♦ **Isotónicas:** Concentraciones = 300mmol/L
- ♦ **Hipertónicas:** Concentraciones > 300mmol/L (FAGUNDO, J., 2004, p. 5)

#### 1.2.3.6. *Dependiendo de los valores de Salinidad*

La concentración de sales disueltas en agua y los sólidos disueltos totales están relacionados con la conductividad eléctrica e indica la capacidad del agua de conducir corriente eléctrica.

- Baja salinidad (STD = 0 a 160mg/ml)
- Salinidad media (STD = 160 a 480mg/ml)
- Salinidad alta (STD = 480 a 1440mg/ml)
- Salinidad muy alta (STD = mayor a 1440mg/ml) (BURBANO, Napoleón., et al. 2013. p. 13)

#### 1.2.3.7. *Dependiendo de la composición física-química*

Para la clasificación física química se usa el método de Kurlov, que considera a aquellos aniones y cationes que sobrepasan el 20% de meq/L y se clasifican de la siguiente manera:

**Cuadro 3-1:** Clasificación según su composición físico química

Con relación a los aniones	Con relación a los cationes
<ul style="list-style-type: none"><li>• Aguas bicarbonatadas</li><li>• Aguas sulfatadas</li><li>• Aguas cloruradas</li><li>• Aguas sulfatocloruradas bicarbonatadas</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Aguas cálcicas</li><li>• Aguas magnésicas</li><li>• Aguas sódicas</li><li>• Aguas calcicomagnesianas</li><li>• Aguas calcosodicas</li><li>• Aguas magnesicosodicas</li><li>• Aguas cálcico- magnésico – sodicas.</li></ul>

Fuente: (FAGUNDO, J., 2004, p. 6)

- **Agua bicarbonatadas.-** Son alcalinas, frías y tiene baja mineralización, se usa por ingesta ya que actúa sobre el metabolismo ya que alcaliniza el pH gástrico reduciendo la acidez y favoreciendo a la digestión. Estas aguas comparten su composición con otros minerales que varían su acción. (AGUIRRE, P. 2007, pp 29-34)
  - Bicarbonatadas sódicas
  - Bicarbonatadas cálcicas
  - Bicarbonatadas mixtas
  - Bicarbonatadas sulfatadas
  - Bicarbonatadas cloruradas
- **Aguas Cloruradas.-** En su composición prevalece el cloruro y puede ser de baja mineralización que forman a las aguas termales, o alta mineralización formando aguas frías. Uno de los usos en afecciones dermatológicas ya que aumentas las defensas de la piel, tiene efecto antiinflamatorio si en su composición hay sodio.
- **Aguas Ferruginosas.-** El hierro es su principal componente, también pueden acompañarse de bicarbonato o sulfato.
- **Aguas Sulfurosas.-** Se encuentra en los suelos fangosos, presenta un pH de 6.5 su agua es hipertermal y mineralización media sulfurada- sulfurosa.
- **Aguas Sulfatadas.-** Aparte de azufre pueden incluir en su composición sodio, calcio, magnesio o cloro. Son muy utilizadas, su temperatura y mineralización varían.
- **Aguas Radioactivas.-** En su composición está presente radón-gas radioactivo. Esta agua no tiene ningún efecto negativo.

- **Aguas Sulfuradas.-** En su composición está presente el azufre, por lo que le da un olor desagradable. (AGUIRRE, P. 2007, pp 29-34)

### 1.3.3. Beneficios de Aguas minerales en relación a su composición química

Debido a la composición que presentan las aguas minerales el efecto beneficioso que ejerce sobre el cuerpo humano es gracias a las diferentes concentraciones de minerales y sales que posee. Investigadores coinciden que la ingestión de estas aguas tiene como fin complementar la presencia de dichas sustancias en el organismo. (AGUIRRE, P. 2007, pp 29-34)

**Cuadro 4-1:** Beneficios de Aguas minerales en relación a su composición química.

TIPO DE AGUA	BENEFICIOS	MODO DE APLICACIÓN
<b>Bicarbonatada</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Función diurética, alcaliniza la orina</li> <li>• Disminuye la acidez</li> <li>• Estimula la secreción pancreática</li> <li>• Ayuda a los procesos digestivos</li> </ul>	Bebida
<b>Bicarbonatada sódica</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hipermotilidad intestinal</li> <li>• Ulceras duodenales</li> <li>• Diarreas</li> <li>• Afecciones hepáticas y renales.</li> </ul>	Bebida
<b>Bicarbonatada cálcica</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mejora la digestión</li> </ul>	Bebida
<b>Bicarbonatada mixtas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mejora la digestión</li> </ul>	Bebida
<b>Bicarbonatada sulfatadas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Intoxicaciones hepáticas</li> <li>• Estreñimiento</li> </ul>	Bebida
<b>Bicarbonatada cloruradas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Afecciones reumáticas</li> </ul>	Bebida
<b>Cloruradas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Afecciones dermatológicas</li> <li>• Aumento de defensas de la piel</li> <li>• Efectos antiinflamatorios</li> <li>• Estimula al peristaltismo intestinal</li> <li>• Disminuye la hipertonia muscular</li> <li>• Aumento de flujo sanguíneo</li> <li>• Afecciones del aparato locomotor (contracturas musculares)</li> <li>• Aumenta las defensas de la piel y mucosas</li> <li>• Estimula las funciones endocrinas, orgánicas y metabólicas.</li> </ul>	Baños, duchas bebida
<b>Ferruginosas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anemias ferropénicas</li> <li>• Obesidad</li> <li>• Reumatismo</li> <li>• Afecciones hepáticas, biliares</li> </ul>	Baños, duchas bebida

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Afecciones dermatológicas</li> <li>• Trastornos del desarrollo infantil</li> </ul>	
<b>Sulfurosas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Afecciones articulares</li> <li>• Procesos reumáticos</li> <li>• Post- operatorios del aparato locomotor.</li> <li>• Anemias, neuralgias, dermatosis pruriginosas</li> <li>• Inflamaciones alérgicas</li> <li>• Asma</li> </ul>	Baños, duchas bebida
<b>Sulfatadas sódicas y magnésicas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Laxante</li> <li>• Afecciones dermatológicas</li> <li>• Prurito</li> <li>• Intoxicaciones por alimentos o medicamentos</li> </ul>	Baños, duchas bebida
<b>Sulfatadas cálcicas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Afecciones gástricas, intestinales, hepatopatías</li> <li>• Acción diurética eliminación de ácido úrico</li> <li>• Gota</li> </ul>	Bebidas, baños, duchas
<b>Sulfatadas cloruradas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Afecciones digestivas</li> <li>• Gastritis</li> <li>• Estreñimiento</li> <li>• Insuficiencia hepática</li> </ul>	
<b>Radioactivas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Afecciones del sistema neurovegetativo, endocrino</li> <li>• Alteraciones en el sistema autoinmune</li> <li>• Afecciones respiratorias crónicas</li> <li>• Reumatológicas y dérmicas</li> </ul>	Baños, inhalaciones
<b>Sulfuradas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Procesos reumáticos</li> <li>• Ezemas</li> <li>• Queratosis</li> <li>• Psoriasis o prurito</li> <li>• Laringitis, bronquitis, rinitis, asma</li> <li>• Afecciones hepáticas.</li> </ul>	Bebida

Fuente: AGUIRRE, P. 2007

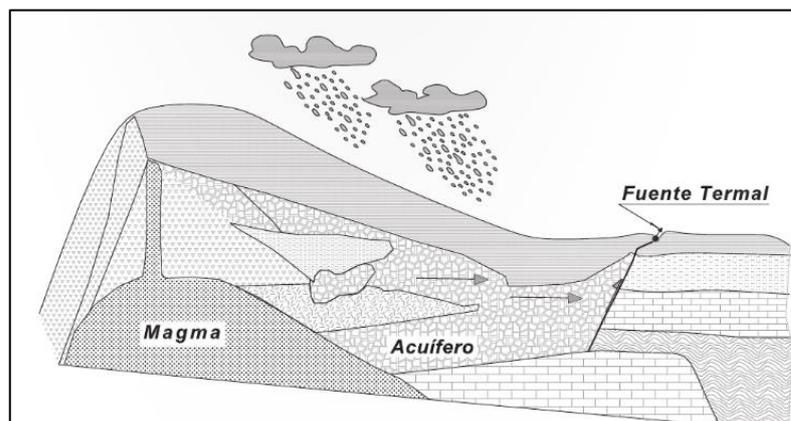
#### ***1.3.4. Agua Termal***

Se considera aguas termales a aquellas que emergen del suelo y que poseen una temperatura al menos 5 grados sobre la temperatura ambiental. Además de contar con una temperatura elevada, se encuentra ionizadas con iones negativos, que son los que le permite al organismo una relajación plena. Son formadas en el seno, del planeta que surgen a más de 20°C puede ser de manera espontánea o mediante grietas que se forman en el suelo, se les atribuye la propiedad de aliviar o restaurar la salud gracias a los componentes físicos y químicos que poseen. (AGUIRRE, P. 2007, pp 29-34)

### 1.3.5. Origen de las aguas termales

Proceden de las capas subterráneas a altas temperaturas, asociadas generalmente a los ambientes volcánicos. Son ricas en componentes minerales. Se dice que los reservorios subterráneos de donde provienen las aguas termales son el resultado de las aguas lluvias que se infiltran por las fisuras de las rocas, fluyen alcanzando grandes profundidades dentro de la capa subterránea, llegando a vecindades de las fuentes de calor asociadas con el magma. (MENDEZ, Avilio. 2010)

Según el INAMHI las teorías sobre el origen del termalismo son variadas, ya que el agua al circular por zonas fisuradas de las rocas y por el efecto termodinámico hace que el agua incremente su temperatura considerablemente. La profundidad de penetración en el suelo expresada en metros se lo conoce como gradiente geotérmico, este gradiente permite que las aguas infiltradas vayan aumentando su temperatura 1 °C por cada 30 a 35 metros de profundidad y en regiones volcánicas se requiere de 10 a 15 metros, hay que añadir que el calor que trasfiere el magma a las rocas puede perjudicar a las aguas juveniles hipertermales. Cuando el agua surge a la superficie a una temperatura mayor a la del ambiente se la denomina agua termal y su composición química la adquiere al entrar en contacto con las rocas gracias a procesos físicos químicos, hidrogeológicos, geológicos, climáticos entre otros que le dan las características de aguas minerales. (BURBANO, Napoleón., et al. 2013. p. 7)



**Figura 2-1:** Origen de las aguas termominerales

Fuente: INAMHI, 2012

Una característica que hay que recalcar de las aguas termales es que están ionizadas. Existen iones positivos y negativos, los iones positivos no son beneficiosos para el cuerpo humano ya que pueden ser irritantes, en cambio los iones negativos cuentan con la capacidad de relajar el cuerpo y las aguas termales contienen iones negativos. (BURBANO, Napoleón., et al. 2013. p. 7)

### 1.3.6. Beneficios de las aguas termales

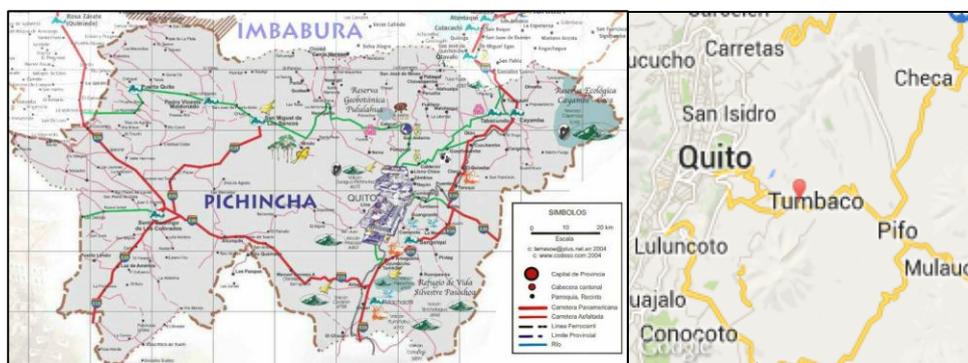
Las aguas termales tienen diferentes efectos en el cuerpo humano, según algunos autores estos beneficios lo dividen en tres biológica, física y química, actuando todos al mismo tiempo. La temperatura del agua ayuda a matar gérmenes, virus, eliminar toxinas que se encuentran en el cuerpo, además aumenta la presión hidrostática del cuerpo y a la vez su oxigenación y la circulación sanguínea. (MENDEZ, Avilio. 2010)

La oxigenación hace que mejore la alimentación de los tejidos, aumenta el metabolismo por lo que las secreciones del tracto digestivo y del hígado se estimulan de esta manera hay una buena digestión. El baño frecuente contribuye a que las funciones de las glándulas endocrinas se normalicen así como el funcionamiento del sistema nervioso central, mejora la relajación mental, estimula el sistema inmune, hay producción de endorfinas y regulación de las funciones glandulares, todo esto se logra ya que el cuerpo absorbe minerales como dióxido de carbono, magnesio, azufre y calcio. (MENDEZ, Avilio. 2010)

## 1.4. Balneario de Aguas Termales Cununyacu, Parroquia Tumbaco

### 1.4.1. Parroquia Tumbaco

La parroquia Tumbaco se encuentra ubicada al lado oriental de Quito a una distancia de 16 Km, con una superficie de 182 Km<sup>2</sup>, limita al Norte con la unión de los ríos San Pedro con el Chiche, al Sur las poblaciones de Pintag y Alangasí separadas por una línea divisoria que atraviesa el Ilaló. Al Este las poblaciones de Puembo y Pifo y el Río Chiche, y al Oeste el Río San Pedro con las poblaciones de Guangopolo, Sambiza y Nayón. La parroquia de Tumbaco tiene una extensión aproximada de 181 Km<sup>2</sup>. (Gad Tumbaco, 2014)



**Figura 3-1:** Mapa de ubicación de la Parroquia Tumbaco.

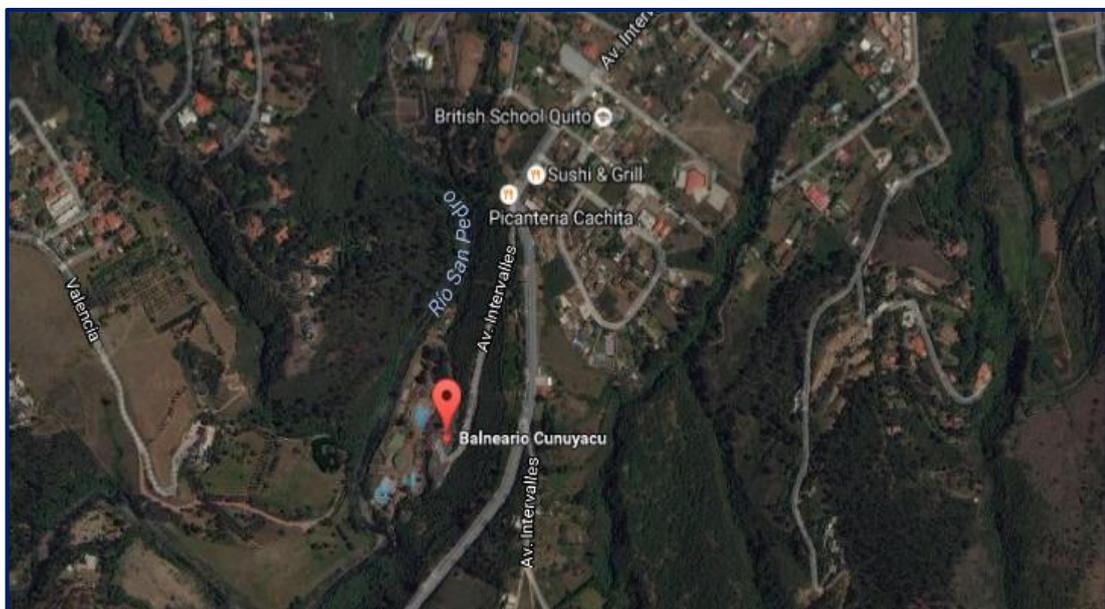
**Fuente:** Datos de mapas de Google 2016

### 1.4.2. Balneario Cununyacu

El balneario “Cununyacu” que en idioma nativo significa “Aguas Calientes” está ubicado en las faldas noroccidentales del cerro Ilaló de la parroquia Tumbaco, en plena vía Intervalles. El balneario llena sus piscinas con agua de origen volcánico, el agua proviene de uno de ojo de agua que existe en la montaña, el mismo es transportado por tubos hacia los reservorios de agua y posteriormente se dirige a las piscinas. El Balneario fue remodelado en 1993 y es propiedad del Ilustre Municipio de Quito, actualmente ocupa una extensión de 5 hectáreas de terreno. (Gad Tumbaco, 2014 p. 1)

Los habitantes de la parroquia Tumbaco acuden a menudo al balneario, a disfrutar de las aguas termales y de sus instalaciones ya que están en contacto con la fauna y flora del lugar. Las aguas del Balneario encuentran a una temperatura de 27°C, y cuentan con propiedades curativas que ayudan a los usuarios a mejorar su circulación sanguínea, aumentar el metabolismo, estimular el sistema inmunológico y estabilizar el sistema nervioso. (Gad Tumbaco, 2014 p. 1)

El balneario Cununyacu cuenta con piscinas tanto para adultos como para niños, canchas multiusos, senderos, y un patio de comidas típicas.



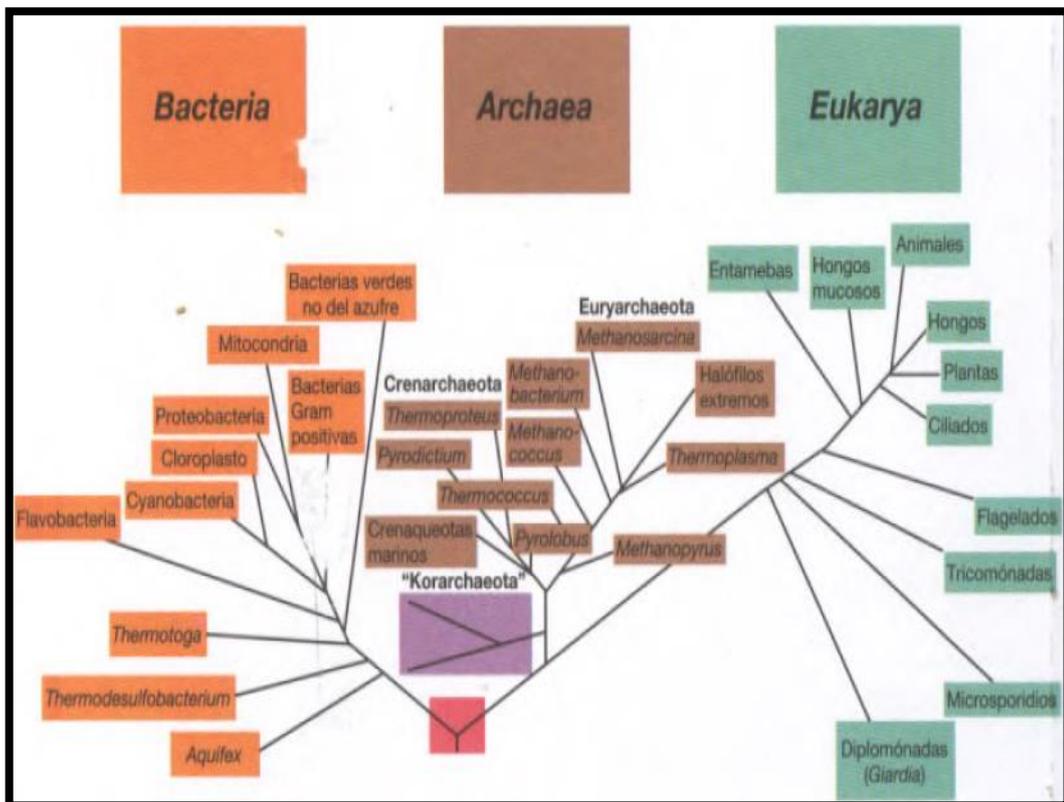
**Figura 4-1:** Mapa de ubicación del Balneario “Cununyacu” (Tumbaco-Pichincha)

**Fuente:** Datos de mapas de Google 2016

## 1.5. Microorganismos

Los microorganismos son seres vivos más numerosos y primitivos existentes en la tierra, se caracterizan por ser de tamaño reducido, tienen la capacidad de pasar inadvertidos a simple vista, y para poder apreciarlos se requiere el uso de equipos como el microscopio óptico o, en algunos casos el microscopio electrónico. La mayoría son unicelulares, aunque una parte significativa tienen organización subcelular y unos pocos forman agrupaciones de células de tipo colonial que no llegan a ser verdaderos organismos pluricelulares. (PRESCOTT, et al., 2004)

Los microorganismos se agrupan en dos categorías, la primera procariotas en la cual se encuentran las *archaeas* y las bacterias, mientras que en la segunda, las eucariotas se encuentran hongos, algas y protozoarios. También se considera como microorganismos a los virus, viroides y priones. La diversidad microbiana depende de la variedad estructural y funcional que presenten los microorganismos así como su morfología, división celular, variaciones en el tamaño celular o bien en la capacidad metabólica y de adaptación. (MONTAÑO, M. et al., 2010)



**Figura 5-1:** Árbol filogenético universal. Dominios: *Bacteria*, *Archaea* y *Eucarya*

Fuente: FASEB, J, 1993, p. 113

### ***1.5.1. Microbiología de las aguas termales***

La diversidad de especies presentes en un determinado hábitat depende de la relación que exista entre los organismos y el ambiente. Existe una gran diversidad de microorganismos autóctonos en aguas minerales de balnearios termales característicos de cada tipo de agua y que dependen de sus propiedades fisicoquímicas como sales minerales, temperatura, pH, nutrientes. Las bacterias autóctonas que predominan en las aguas termales son heterótrofas oligotróficas pertenecientes a los géneros *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Enterobacter*, *Staphylococcus*, y *Acinetobacter* y en menor cantidad se encuentran las bacterias autótrofas. (DE LA ROSA. 2004, p. 153)

También se puede encontrar en las aguas termales microorganismos que proceden de otras hábitats (vegetales, suelo, heces) denominados alóctonos que se los puede considerar como contaminantes y que se adaptan a las condiciones adversas pudiendo convivir con los microorganismos autóctonos estos pueden ser: *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella* y *Legionella*. (DE LA ROSA. 2004, p. 153)

### ***1.5.2. Microorganismos autóctonos***

El punto de emergencia de los manantiales termales, puede tener una población microbiana alta, pero muchos de estos microorganismos están en estado durmiente y no se reproducen, por lo que el número de microorganismos viables es pequeño dependiendo de la temperatura de incubación y medio de cultivo usado, puede haber de 10-10<sup>3</sup> por mL. La gran mayoría de bacterias crecen a una temperatura de 37°C (mesófilas), y existen bacterias capaces de crecer a una temperatura de más de 45°C (termófilas). El número de bacterias esporuladas es bajo de 10 a 10<sup>2</sup> por mL. Las bacterias que predominan son las heterótrofas y oligotróficas ya que requieren de carentes requerimientos de nitrógeno y carbono. Y en menor número se han encontrado microorganismos autótrofos, tanto quimiolitotrofos como fototrofos. Son anaerobios facultativos, con pigmentos y son móviles. Las bacterias heterótrofas son amonificantes proteolíticas, amilolíticas y en menor proporción celulolíticas, no suelen fermentar azúcares y se les considera beneficiosas ya que autodepuran el agua cuando se contaminan accidentalmente con material orgánico. (DE LA ROSA. 2004, p. 155)

En aguas sulfuradas están presentes las bacterias capaces de oxidar el azufre y el sulfhídrico (*Beggiatoa*, *Thermothrix*, *Thiobacillus*, así como bacterias sulforreductoras como *Desulfotomaculum*, *Desulfovibrio* En aguas ferruginosas se encuentran bacterias que oxidan el

ion ferroso a férrico para obtener energía como *Clonothrix*, *Leptothrix*, *Leucothrix*, *Sphaerotilus*. En manantiales clorurados sódicos e hipertónicos es común encontrar bacterias halófilas moderadas como *Halomonas*, *Micrococcus*, *Vibrio* y halotolerantes como *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Planococcus*. (DE LA ROSA. 2004, pp. 155-156)

En las aguas hipertermales las bacterias predominantes son las Gram positivas ya que son más resistentes al calor, mientras que en las aguas mesotermas predominan las bacterias bacilos Gram negativos y cocos Gram positivos. Los géneros identificados son *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Enterobacter*, *Acinetobacter* y *Arthrobacter*. (Mosso et al. 1994).

El género *Pseudomonas* se encuentra en ambientes acuáticos con pocos nutrientes las especies del grupo fluorescente encontradas en estas aguas, como *P. fluorescens* y *P. putida*, población autóctona de manantiales meso e hipotermas. En agua con menor temperatura es frecuente la presencia de bacilos Gram negativos como *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Vibrio*, *Aeromonas*. (DE LA ROSA. 2004, p. 156)

Les muy común encontrar en aguas minerales la presencia de cocos Gram positivos, *Staphylococcus* y *Micrococcus*, ya que resisten altas concentraciones de sal. Las especies del género *Bacillus* tienen una amplia distribución y pueden proceder del suelo o de las propias aguas. Otros géneros que están presentes en las aguas y además son cocos positivos son *Planococcus*, *Vagococcus* y *Marinococcus*, típicos de ambientes acuáticos dulces y marinos. (DE LA ROSA. 2004, p. 156)

El género *Enterobacter*, se considera que forma parte de la micropoblación autóctona ya que se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza. En aguas carbónicas o hipertermales, se encuentran bacilos Gram positivos como *Arthrobacter*, *Kurthia*, *Cellulomonas*, *Corynebacterium*, *Exiguobacterium*, *Rubrobacter*, y otros difíciles de identificar, cuyo hábitat podría ser el suelo pero han podido adaptarse a vivir en condiciones adversas. (DE LA ROSA. 2004, p. 156)

### **1.5.3. Microorganismos alóctonos**

Desde el punto de vista sanitario, las aguas termales no deberían poseer bacterias patógenas, ni indicadores fecales pero se han encontrado en algunas aguas mineromedicinales coliformes, enterococos, *Clostridium* sulfito reductores y *Pseudomonas aeruginosa*. La presencia de coliformes totales no es indicativa de riesgo sanitario ya que pueden provenir del suelo o de las

plantas que están a su alrededor, y sobrevivir en ambientes acuáticos por su facilidad de adaptación ya que forman biofilm. (Lechevalier et al.1987).

La *P. aeruginosa* es un patógeno oportunista que provoca infecciones en personas inmunodeprimidas por lo que su presencia en aguas mineromedicinales no es deseable y puede indicar una baja protección del manantial, aunque se lo ha podido encontrar en aguas subterráneas que no tienen contacto con el hombre. (Leclerc y Mossel, 1989)

Se ha encontrado en baja proporción a microorganismos eucariotes como algas, hongos y mohos de géneros *Penicillium*, *Aspergillus* y *Alternaria*, estos géneros no presentan riesgos sanitarios al encontrarse en baja proporción en el agua ya que están ampliamente distribuidos en la naturaleza. (DE LA ROSA. 2004, pp. 155-156)

## **1.6. Análisis Microbiológico de las Aguas Termales**

El análisis microbiológico de las aguas termales se realiza para determinar e identificar los microorganismos que las aguas poseen. (Gómez, et al., 2002, p. 535)

### ***1.6.1. Microorganismos Indicadores***

Los microorganismos indicadores, son aquellos que nos permiten establecer las condiciones de calidad sanitaria del agua, cuando esta es buena o mala. Cuando se comprueba la presencia de grupos indicadores se puede deducir que los microorganismos patógenos están presentes en la misma cantidad y mantienen un comportamiento similar a la del indicador frente a factores tales como temperatura, pH, nutrientes, entre otros. (WORDPRESS, 2010)

### ***1.6.2. Coliformes totales***

Pertencen a la familia *Enterobacteriaceae* y constituyen todos los bacilos Gram negativo, son capaces de fermentar lactosa y producen ácido y gas a una temperatura de incubación de 30-37 °C durante 48 horas. (WORDPRESS, 2010)

### ***1.6.3. Coliformes fecales***

Los coliformes fecales son aquellos que fermentan lactosa en presencia de sales biliares a una temperatura de 44 y 45°, y un tiempo de incubación de 24-48 horas. “Los coliformes fecales comprenden principalmente *Escherichia coli* y algunas cepas de *Enterobacter* y *Klebsiella*.” (WORDPRESS, 2010)

### ***1.6.4. Aerobios mesófilos***

Se denominan así a las bacterias heterótrofas aerobias y anaerobias facultativas, mesófilas y psicotróficas, que son capaces de crecer en agar nutritivo, se investiga por el método de recuento en placa. Se desarrolla en presencia de oxígeno, a una temperatura de incubación de 30 a 37 °C durante un periodo de 24 horas. (WORDPRESS, 2010)

### ***1.6.5. Staphylococcus***

El género *Staphylococcus* pertenece a la familia *Staphylococcaceae*, formado por cocos Gram positivos, presentan un diámetro de 0,5 a 1,5  $\mu\text{m}$  y se los puede encontrar en cadenas cortas, tétradas, en pares, formando racimos de uvas o en cadena. Estas bacterias no poseen capsula, producen catalasa que es una característica útil para diferenciar el género *Staphylococcus* de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus*. Son bacterias no móviles, no esporuladas y se desarrollan a una temperatura de incubación de 37°C durante 24 horas. (WORDPRESS, 2010)

### ***1.6.6. Hongos y levaduras***

**Hongos.-** Es un hongo que puede encontrarse al aire libre y en interiores. Su crecimiento es mejor en condiciones cálidas, y húmedas, que sempropaga mediante esporas. Las esporas del moho pueden sobrevivir en condiciones ambientales, como la sequedad. Su temperatura de incubación es de 25 °C y durante un periodo de 3 a 5 días. (PFALLER, M. et al., 2007 p. 2)

**Levaduras.-** Son organismos que pertenecen al reino de los hongos, son heterotróficos ya que solo pueden alimentarse de materia ya preformada. Las levaduras forman en el medio de cultivo colonias pastosas, constituidas por células esféricas, ovoideas, alargadas o elipsoidales. Su tamaño puede ir de 1 a 9  $\mu\text{m}$  de ancho y 2 a más de 20  $\mu\text{m}$  de longitud según la especie, nutrición, edad y otros factores, se desarrollan a una temperatura de 25 °C durante un periodo de 3 a 5 días. (PFALLER, M. et al., 2007 p. 2)

## **1.7. Medios de cultivo**

Los medios de cultivo son una mezcla de nutrientes que, en condiciones físicas óptimas, y concentraciones adecuadas permiten el crecimiento de los microorganismos, ya que es uno de los sistemas más importantes que nos permiten identificar los microorganismos. Para que las bacterias crezcan sin problema el medio debe tener una temperatura, presión de oxígeno, grado de humedad, acidez y alcalinidad adecuadas. El medio de cultivo debe estar libre de todo microorganismo contaminante y tener nutrientes y factores de crecimiento necesarios. (WORDPRESS, 2012 pp. 1-2)

### ***1.7.1. Clasificación de los medios de cultivo según su consistencia***

La consistencia de los medios de cultivo es uno de los métodos más simples para poder clasificarlos. Existen medios de cultivo líquidos (caldos) y medios de cultivo sólidos. Ambos medios cuentan con nutrientes que favorecen el crecimiento bacteriano, la única diferencia es que el medio de cultivo sólido cuenta con una sustancia llamada Agar la cual le brinda consistencia y solidez al medio.

- Medio semisólido.- este medio ayuda a determinar si las bacterias tienen movilidad, y se prepara agregando un agente solidificante en menor proporción que en el medio sólido. (WORDPRESS, 2012)

### ***1.7.2. Medios de cultivo según su utilización.***

- ✓ Medios comunes.- Son aquellos medios que poseen muy pocos componentes ya que la bacteria no necesita requerimientos especiales para su crecimiento. Por ejemplo el Agar Tripticase de Soja, el Agar Columbia.
- ✓ Medios de enriquecimiento: Son aquellos medios que poseen muy pocos componentes sustancias nutritivas indispensables para el crecimiento de microorganismos exigentes, el enriquecimiento puede ser mediante la adición de sangre, leche, suero, huevo, bilis, etc, que aportan dichos nutrientes, o adicionar suplementos artificiales tales como Polivitex, Isovitalax, etc)
- ✓ Medios selectivos: Son aquellos medios que permiten el crecimiento específico de determinados microorganismos cuando este se encuentra en una población mixta, por ejemplo el caldo selenito, que se usa para facilitar el crecimiento de salmonellas y frenar el del resto de enterobacterias.

- ✓ Medios inhibidores: Son aquellos medios que contienen componentes que inhiben el total crecimiento de una población microbiana específica, esto se consigue añadiendo sustancias antimicrobianas. Un ejemplo es el agar MacConkey el cual inhibe el crecimiento de las bacterias Gram positivas.
- ✓ Medios diferenciales: Son aquellos medios que evidencian las características bioquímicas que ayudan a diferenciar géneros o especies. Por ejemplo el medio MacConkey es un medio diferencial porque permite distinguir los gérmenes que fermentan la lactosa de aquellos que no lo hacen.
- ✓ Medios de identificación: Son aquellos medios que permiten comprobar cualidades útiles para la identificación de los microorganismos. Por ejemplo el Agar Kligler, el medio de Simmons y en general, cualquier medio al que se le haya añadido un elemento diferencial, son medios utilizados en identificación.
- ✓ Medios de multiplicación: Son aquellos medios que permite la obtención de células a partir de microorganismos aislados. Por ejemplo el Caldo-Infusión Cerebro-Corazón (BHI).
- ✓ Medios de transporte: Son aquellos medios que se usan para transportar muestras clínicas cuando las mismas no pueden ser sembradas, para ello se introduce el hisopo con el cual se tomó la muestra en el medio, generalmente el medio se encuentran colocados en tubos. Por ejemplo los medios de Stuart Amies, Cary-Blair.
- ✓ Medios de conservación: estos medios son útiles para conservar cepas por largos periodos de tiempo. (WORDPRESS, 2012)

### 1.7.3. Placas *Petrifilm*



**Figura 6-1:** Placas *Petrifilm*

**Fuente:** [www.edicionesespeciales.elmercurio.com](http://www.edicionesespeciales.elmercurio.com)

Las Placas 3M™ *Petrifilm*™ (Figura 6-1), son un soporte físico donde se coloca un medio de cultivo deshidratado, contiene agentes gelificantes que son soluble en agua fría, las placas ayudan a la determinación y conteo rápido de microorganismos, estos métodos son

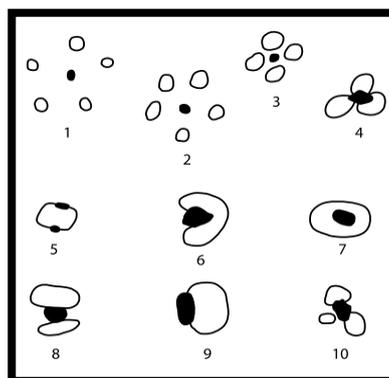
reconocidos como Métodos Oficiales de Análisis, por ser pruebas más eficientes que los métodos tradicionales. Son una extraordinaria herramienta que nos permite obtener resultados en poco tiempo y existen menos errores humanos, ya que solo consiste en realizar la siembra, incubar e interpretar los resultados. (3M, 2014)

Existen placas 3M Petrifilm específicas para cada microorganismo como recuento de aerobios totales, *E.coli*/Coliformes totales, Staph Express y de mohos y levaduras. Las Placas 3M™ Petrifilm™ ayuda a ahorrar tiempo ya que están listas para su uso, están diseñadas para aumentar la productividad y consistencia, además los costes son más bajos. La FDA define los coliformes como bastoncillos Gram-negativos que producen gas y ácido de la lactosa. (3M, 2014)

#### 1.7.3.1. Las Placas Petrifilm™ para el Recuento de *E.coli*/Coliformes

Las placas *Petrifilm*™ de *E.coli*/Coliformes contiene en su composición nutrientes como Bilis, Rojo Violeta, un indicador de la glucuronidasa, un agente gelificante soluble en agua fría y un indicador que facilita la enumeración de las colonias de *E.coli*/Coliformes. Aproximadamente el 95% de las colonias de *E. coli* producen gas y toman una coloración azul y rojo-azules, además el 97% produce beta-glucuronidasa, que da una coloración azul que se asocia con la colonia.

El gas que es producido alrededor de las colonias *E. coli*/Coliformes (Figura 7-1) fermentadores de lactosa es atrapada por la película superior del petrifilm y confirman su presencia. (3M, 2014)



**Figura 7-1:** Ejemplo de burbujas asociada con las colonias productoras de gas.

Fuente: 3M, 2014

#### *1.7.3.2. Las Placas Petrifilm™ para el Recuento de Staph Express*

Las placas Petrifilm Staph Express son útiles para el recuento de *Staphylococcus aureus*. Las placas permiten obtener resultados en menor tiempo. Las colonias que crecen de color rojo-violeta son indicadoras de *Staphylococcus aureus*. Los resultados se obtienen a las 22 horas a una temperatura de 35-37°C. (3M, 2014)

#### *1.7.3.3. Las Placas Petrifilm™ para el Recuento de Aerobios*

Las Placas Petrifilm para Aerobios son placas que contienen un tinte indicador rojo que colorea las colonias ayudando a un mejor conteo. Se usan para el conteo total de población existente bacteriana que existe en productos. (3M, 2014)

#### *1.7.3.4. Las Placas Petrifilm™ para el Recuento Mohos y Levaduras*

Las placas Petrifilm para Mohos y Levaduras permiten el recuento de colonias pertenecientes a mohos y levaduras que se encuentran en ambientes y superficies en un periodo de 3 a 5 días y a una temperatura de 25°C. Las placas ayudan al crecimiento de Mohos y Levaduras en ambientes superficiales y su posterior identificación. Son fáciles de identificar ya que los mohos son colonias grandes con foco central, colores variables y bordes difusos, mientras que las levaduras son colonias pequeñas de color verde-azuladas, sin foco central y sin bordes definidos. (3M, 2014)

#### *1.7.3.5. Agar Mueller Hinton*

El Agar Mueller Hinton (Figura 7-1) medio de cultivo no selectivo que favorece el desarrollo de microorganismos. Se recomienda su uso para las pruebas de sensibilidad antimicrobiana. Es útil para la realización de antibiogramas debido a que cuenta con buena producibilidad lote a lote en pruebas de sensibilidad, los patógenos crecen satisfactoriamente. Es muy útil al adicionar sangre de carnero al 5% ya que sirve para el cultivo y aislamiento de microorganismos nutricionalmente exigentes y para las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en especies de estreptococos. El medio cumple con los requerimientos de la Organización Mundial de la Salud y está especificado en la FDA. (BRITANIA, 2010 p.1)



**Figura 8-1:** Agar Mueller Hinton  
Fuente: BIOMEDICINA, 2010

#### 1.7.3.6. Agar Manitol Salado

El Agar manitol salado (Figura 8-1) es un medio de cultivo selectivo y diferencial, usado para diferenciar y aislar estafilococos, los componentes como el extracto de carne, la peptona de carne y la tripteína, constituyen la fuente de carbono, nitrógeno, vitaminas y minerales que promueven el desarrollo microbiano. El cloruro de sodio constituye el agente selectivo que inhibe el desarrollo de la flora acompañante, el rojo fenol es el indicador de pH, el manitol es el Hidrato de Carbono fermentable, y el agar es el agente solidificante (WORDPRESS, 2012 pp. 10-13)

Es un medio diferencial debido a la capacidad de fermentación del manitol por los microorganismos y selectivo debido a su alta concentración salina. Las bacterias que crecen en un medio con alta concentración de sal y fermentan el manitol, producen ácidos, con lo que se modifica el pH del medio y vira el indicador de pH del color rojo al amarillo. (WORDPRESS, 2012 pp. 10-13)



**Figura 9-1:** Agar Manitol Salado  
Fuente: BIOMEDICINA, 2010

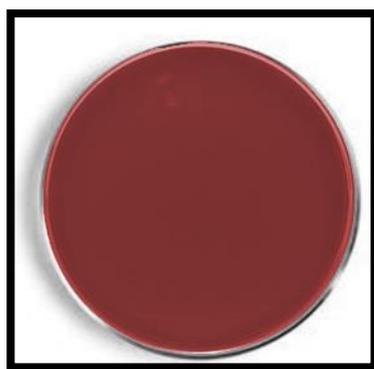
### 1.7.3.7. Agar Eosina Azul de Metileno

El Agar Eosina Azul de Metileno (Figura 9-1) se usa para el aislamiento y diferenciación de bacilos Gram negativos, y para la diferenciación de organismos fermentadores y no fermentadores de lactosa. La sacarosa y lactosa se añaden como carbohidrato fermentable ya que permite detectar coliformes, la peptona aporta nitrógeno minerales, aminoácidos esenciales y vitaminas para el crecimiento, son inhibidores parciales de bacterias Gram-positivas e indicadores de pH. La presencia de lactosa y sacarosa en el medio permite diferenciar las bacterias que son sacarosa positiva como *Proteus vulgaris*, *Citrobacter* y *Aeromonas*, y las bacterias que son lactosa negativa *Salmonella* y *Shigella*. (PRONADISA, 2010)

**Cuadro 5- 1:** Crecimiento de Microorganismos en Agar Eosina Azul de Metileno.

Microorganismos	Tipo de Colonia
<i>Escherichia coli</i>	Verdosas con brillo metálico y centro negro azulado
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Mucosas, rosa púrpura, confluentes
<i>Proteus mirabilis</i>	Incoloras
<i>Enterococcus faecalis</i>	Incoloras, pequeñas, puntiformes
<i>Shigella flexneri</i>	Incoloras
<i>Salmonella typhimurium</i>	Incoloras

Fuente: BRITANILAB, 2012



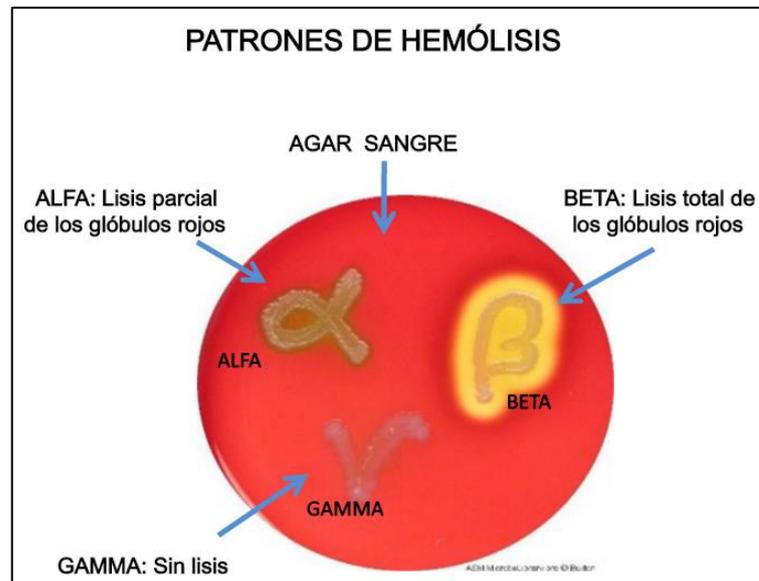
**Figura 10-1:** Agar Eosina Azul de Metileno

Fuente: BIOMEDICINA, 2010

### 1.7.3.8. Agar Sangre

El Agar Sangre es un medio de cultivo enriquecido preparado para la recuperación y aislamiento de microorganismos Gram-positivos como Gram-negativos, hongos y levaduras incluyendo aquellos de crecimiento exigente como *Haemophilus spp* y *Listeria*. El medio se adiciona

sangre de cordero, pero también se puede usar sangre humana, con el fin de establecer en los microorganismos características de hemólisis (alfa, beta ó gamma) que puedan ayudar a la identificación del patógeno. (Figura 11-1). (MEDIBAC, 2015)



**Figura 11-1:** Patrones de Hemólisis  
Fuente: ARANGUEREN, Y. 2014

#### 1.7.3.9. Agar MacConkey

El agar Mac-Conkey (Figura 11-1), es un medio de cultivo selectivo y diferencial que permite el crecimiento de enterobacterias. Es inhibitorio de cocos Gram positivos y la lactosa que es el hidrato de carbono fermentable, permite diferenciar los microorganismos fermentadores de los no fermentadores por el cambio de color de la colonia. La colonia fermentadoras de lactosa son *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* que se tornan de color rosado, colonias incoloras son lactosa negativa. . (MEDIBAC, 2015)

La lactosa, sales biliares y el cristal violeta son los agentes selectivos que inhiben el desarrollo de la flora Gram positiva. Debido a la fermentación de la lactosa, el pH alrededor de la colonia disminuye, esto produce un viraje del color del indicador de pH (rojo neutro), la absorción en las colonias, y la precipitación de las sales biliares. (MEDIBAC, 2015)



**Figura 12-1:** Agar MacConkey  
Fuente: MEDIBAC, 2015

**Cuadro 6-1:** Aspecto de crecimiento de Microorganismos en Agar MacConkey

Microorganismos	Colonias
<i>Escherichia coli</i>	Rojas con halo turbio
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Rosadas mucosas
<i>Salmonella typhimurium</i>	Incoloras, transparentes
<i>Shigella flexneri</i>	Incoloras, transparentes
<i>Proteus mirabilis</i>	Incoloras, transparentes
<i>Enterococcus faecalis</i>	Diminutas, incoloras, opacas

Fuente: BRITANIALAB, 2012

#### 1.7.3.10. Agar *Salmonella Shigella*

El Agar *Salmonella Shigella* es un medio selectivo y diferencial que ayuda al aislamiento de bacilos entéricos patógenos, pertenecientes al género *Salmonella*. El Agar se considera un medio selectivo ya que presenta una inhibición hacia los microorganismos Gram positivos y Enterobacterias diferentes de *Salmonella* y *Shigella* ya que las sales biliares, verde brillante y citratos permiten esta inhibición. La diferenciación de los organismos entéricos es posible gracias a la incorporación de lactosa en el medio. (Figura 12-1) (BECTON DICKINSON, 2013)



**Figura 13-1:** Agar *Salmonella Shigella*  
Fuente: MEDIBAC, 2015

**Cuadro 7-1:** Aspecto de crecimiento de Microorganismos en Agar *Salmonella Shigella*

Microorganismos	Colonias
<i>Salmonella typhimurium</i>	Transparentes, centro negro
<i>Shigella flexneri</i>	Incoloras
<i>Shigella sonnei</i>	Incoloras
<i>Proteus mirabilis</i>	Transparentes, centro negro
<i>Escherichia coli</i>	Rosadas a rojas
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Rosadas cremosas y mucosas
<i>Enterococcus faecalis</i>	Incoloras, de muy escaso crecimiento

Fuente: BRITANIALAB, 2012

## 1.8. Identificación Microbiana

Se entiende por identificación microbiana al conjunto de técnicas y métodos que se usan para la identificación de un microorganismo. En la mayoría de los casos la identificación se realiza en base a la combinación de más de uno método, se realiza mediante las características fenotípicas de los microorganismos, puesto que su realización y coste los hace más asequibles. Otros métodos son los genotípicos, suelen reservarse para los microorganismos que no se pueden identificar con métodos convencionales. (CERDENADO, E.; CANTON, R. 2010)

La identificación fenotípica bacteriana se basa en las características observables de las bacterias, como su morfología, desarrollo, propiedades bioquímicas y metabólicas. Este método permite el aislamiento del microorganismo implicado, su identificación, el estudio de sensibilidad a los antimicrobianos y facilita la aplicación de marcadores epidemiológicos. En el

cultivo es esencial la correcta elección del medio de crecimiento y la temperatura de incubación que requieran. El método fenotípico, permite el aislamiento del microorganismo implicado, el estudio de su sensibilidad antimicrobiana y facilita la aplicación de marcadores epidemiológicos. (CERDENADO, E.; CANTON, R. 2010)

### ***1.8.1. Morfología macroscópica de los microorganismos***

Las bacterias pueden multiplicarse y ser visibles como colonias a las 24 horas después de ser sembradas en medios de cultivo sólidos adecuados, además de estar en una atmósfera que favorezca su crecimiento y contar con una temperatura óptima de incubación. Hay excepciones ya que algunos microorganismos requieren de dos a ocho semanas de incubación para su crecimiento como en el caso de *M. tuberculosis*. La forma que presente la colonia también depende de la movilidad de la bacteria, el tamaño puede ser de 0.5 µm o ser más grandes como el caso de las Enterobacterias. (PIREZ, M & MOTA M. 2008)

**Cuadro 8-1:** Características morfológicas de las bacterias

<b>Forma</b>	Circular, Irregular, filamentosa
<b>Bordes</b>	Ondulados, sierra, dentados, lisos
<b>Superficie</b>	Plana, convexa, mamelonada, umbilicada
<b>Pigmento</b>	Verde, amarillo, grisáceo.
<b>Luz</b>	Brillante, opaca.
<b>Olores</b>	Frutal, putrefacto
<b>Consistencia</b>	Lisa, rugoso, mucoide

**Fuente:** (PIREZ, M & MOTA M. 2008)

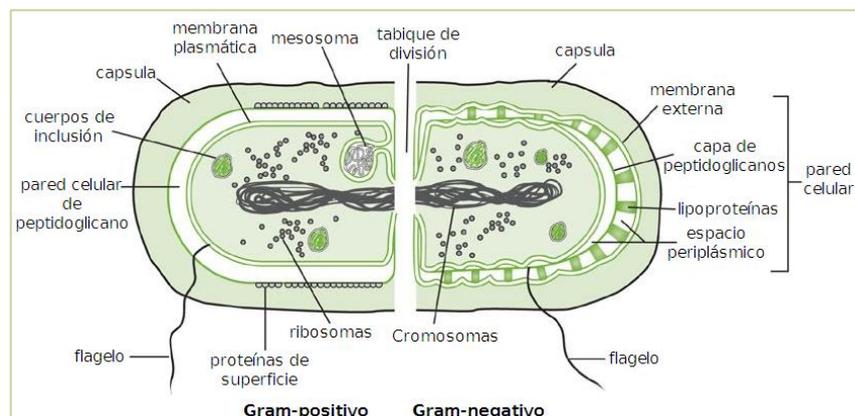
Las colonias mucoides tienen un aspecto brillante, acuoso, que son propias de las bacterias capsuladas como *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*. Las formas capsuladas generalmente son más virulentas. Las colonias lisas tienen un aspecto homogéneo, textura uniforme y provienen de microorganismos aislados de su hábitat natural como las enterobacterias. Las colonias rugosas tienen un aspecto granuloso, son colonias que carecen de proteínas o polisacáridos de superficie. (PIREZ, M & MOTA M. 2008)

### 1.8.2. Coloración Gram, Bacterias Gram positivas y Gram negativas.

La coloración Gram es una técnica de coloración de contraste, se utiliza rutinariamente en estudio microbiológico de bacterias. Descubierta por Hans Christian Gram en 1884, el fundamento de la técnica se hace con base a las paredes celulares de las bacterias. La coloración juega un papel importante en la diferenciación taxonómica y morfológica de las bacterias debido a que las mismas se clasifican en dos grupos dependiendo de si retienen o no el colorante de base en la tinción.

- Las bacterias Gram negativas poseen una capa de péptidoglicano delgada y se une a una segunda membrana plasmática exterior por medio de lipoproteínas. (MADIGAN, Michael et al. 2004. p. 56).
- Las bacterias Gram positivas poseen en su estructura una sola membrana lipídica haciendo que la pared de péptidoglicano sea más gruesa y retenga mejor el colorante, el mismo se tiñe de color azul o violeta (MARÍN, Rafael. 2003. p. 75).

La diferencia entre ambas se determina por la composición química y permeabilidad de la pared celular, la pared de las bacterias Gram negativas es delgada y presenta un contenido en grasas y lípidos en mayor concentración que en las Gram positivas lo cual dificulta la coloración haciendo que el citoplasma de la bacteria no retenga tanto colorante. (MADIGAN, Michael et al. 2004. p. 56).

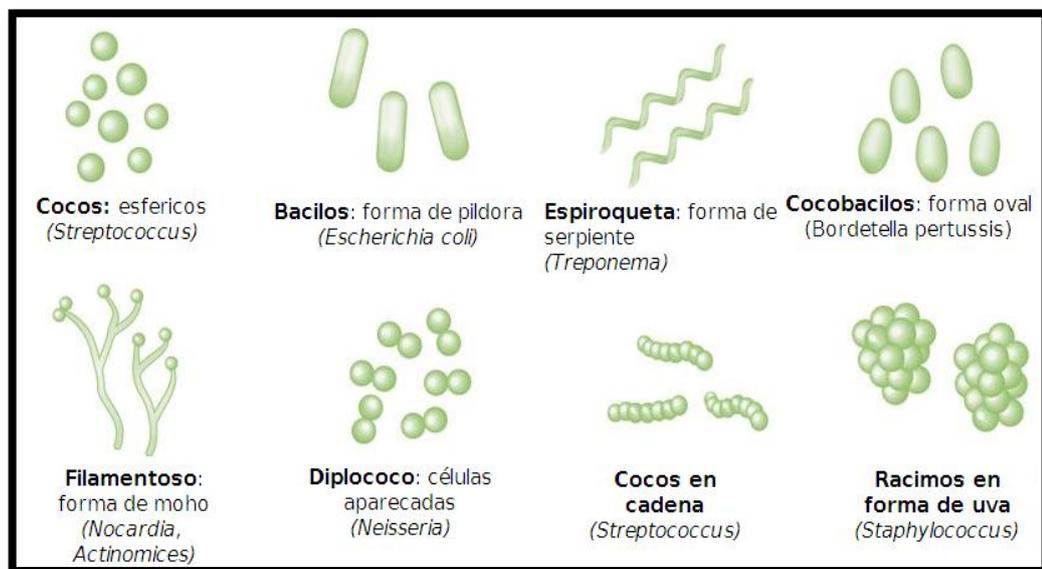


**Figura 14-1:** Diagrama de la pared bacteriana Gram positiva y Gram negativa  
Fuente: MADIGAN, Michael et al. 2004. p. 56).

### 1.8.3. Morfología microscópica de los microorganismos

Las bacteria presentan una diversidad de formas (figura 14-1, entre las cuales pueden ser esféricas (cocos), cilíndrica (bacilos), de coma (vibrios) o helicoidal (espirilos), la pared celular es una de las principales características para poder identificar la forma de las bacterias ya que pueden presentarse como células aisladas o formando grupos. Las principales formas de agrupamiento de las bacterias son:

- Estreptococos y estreptobacilos: cadenas de cocos o de bacilos, respectivamente.
- Estafilococos: agrupaciones en forma de racimos de cocos
- Diplococos: (parejas de cocos)
- Sarcinas: agrupaciones en tétradas o en grupos de ocho cocos dispuestos en forma de cubo. (RODRIGUÉZ, 2015)



**Figura 15-1:** Morfología. y estructura bacteriana

Fuente: PIREZ, M. 2002

Los bacilos también pueden encontrarse aislados o agrupados, cuando permanecen juntos luego de sufrir un proceso de división.

- Cocobacilos: Son bacilos pequeños, redondos muy difícil de distinguir de los cocos.
- Diplobacilos: Pares de bacilos unidos en pares.
- Estreptobacilos: Bacilos que se agrupan en cadenas.
- Formas filamentosas: Bacilos que crecen en forma de fibras.

- Bacilos fusiformes: Bacilos que presentan en su forma extremos más delgados.

El tamaño de las células bacterianas es variable oscilando entre 0,5µm de diámetro y hasta 5 µm longitud en las especies de mayor tamaño, pero de tamaño más reducido que una célula eucariota normal. Las formas en las células eucariotas son más variadas, desde formas elipsoidales en las levaduras, y en protozoos formas complejas mantenidas por sistemas de citoesqueleto. (RODRIGUÉZ, 2015)

## **1.9. Pruebas Bioquímicas**

Son pruebas que consisten en la realización de distintos test químicos aplicados a las bacterias que se desean identificar, los cuales conociendo su reacción nos permitirá identificar los microorganismos allí presentes. Se dispone de una variedad de medios los cuales se aplican de acuerdo a las exigencias del microorganismo en estudio. (FERNÁNDEZ, A. et al. 2006)

### ***1.9.1. Prueba de la catalasa***

Esta prueba tiene como finalidad determinar la presencia de la enzima catalasa en las bacterias, la cual hace posible que el peróxido de hidrogeno se descomponga en oxígeno y agua. El peróxido de hidrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) se forma como producto terminal oxidativo de la descomposición de los azúcares produciendo la muerte de la célula por ser muy tóxico. (BOQUET, et al., 1995 p. 132)

La enzima se encuentra en las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que tienen citocromo, la mayoría de las bacterias anaerobias no poseen catalasa, pero en lugar de esta poseen una enzima flavoproteínica NADH<sub>2</sub> peroxidasa, que también cumple la función de descomponer el peróxido de hidrógeno, produciendo únicamente agua. (BOQUET, et al., 1995 p. 132)

### ***1.9.2. Prueba de la oxidase***

La prueba se usa para determinar la presencia de enzimas oxidasas (citocromo-oxidasa) que activa la oxidación del citocromo que es reducido por el oxígeno, la cual produce agua o peróxido de hidrogeno. Generalmente los organismos que poseen esta enzima son aerobios o anaerobios facultativos ya que únicamente la prueba es positiva cuando los organismos se

desarrollan en presencia de oxígeno. El oxígeno actúa como aceptor final de electrones en su cadena transportadora. (BOQUET, et al., 1995 p. 130)

### ***1.9.3. Prueba de la Coagulasa***

La prueba de la coagulasa permite poner en manifiesto la enzima coagulasa que poseen algunos *Staphylococcus*, la enzima es la que estimula la conversión de fibrinógeno en fibrina haciendo que se coagule el plasma y la misma nos permite diferenciar el *Staphylococcus aureus*, de otras especies. (BOQUET, et al., 1995 p. 133)

### ***1.9.4. Prueba del NaCl 6,5 %.***

Capacidad que tienen los enterococos de poder crecer en una concentración de 6,5% de NaCl. Esta prueba permite diferenciar las especies de *Enterococcus* de los *Streptococcus* del grupo D. El medio de cultivo además de tener en su composición NaCl, tiene glucosa y un indicador de pH que es el púrpura de bromocresol. (BOQUET, et al., 1995 p. 131)

### ***1.9.5. Agar OF de Hugh y Leifson***

Esta prueba indica el tipo de metabolismo oxidativo (O) o fermentativo (F) que presenta las bacterias, el sustrato que se usa es la glucosa, el indicador es el azul de bromo timol ya que este ayuda a detectar la acumulación de ácidos. La incubación se realiza en atmósfera anaeróbica y aeróbica. Las bacterias que crecen en el medio de cultivo que no está cerrado con parafina son las aerobias, transforman la glucosa en CO<sub>2</sub> y la superficie del medio cambia de color a amarillo. Las bacterias fermentadoras producen ácidos a partir de la glucosa. La producción de ácido se observa por el viraje del indicador al amarillo. (ALVAREZ, M., et al. 1990, p. 21)



**Figura 16-1:** Agar Hugh Leifson

Fuente: IZURIETA 2011

#### ***1.9.6. Agar Hierro de Kligler (KIA)***

Se usa para la identificación de enterobacterias en base a la capacidad de fermentar la glucosa, lactosa, producción de gas y producción de hidrogeno sulfurado. Contiene nutrientes como peptona de carne y tripteina que colaboran en el desarrollo de las bacterias, contiene lactosa y glucosa como carbohidrato, el cambio de color se da por el indicador rojo fenol el cual vira el medio a color amarillo al producir acido, en medios alcalinos el medio se torna rojo. (ALVAREZ, M., et al. 1990, p. 21)

El tiosulfato de sodio es un sustrato para la producción de ácido sulfhídrico, citrato de hierro y amonio como fuente de iones  $Fe^{3+}$ , estos al combinarse con el ácido sulfhídrico se reduce a sulfuro de hidrogeno y al combinarse con una sal de hierro se transforma en sulfuro de hierro, esto se detecta cuando el medio de cultivo toma una coloración negra. (ALVAREZ, M., et al. 1990, p. 21)

#### ***1.9.7. SIM (Sulfhídrico Indol Movilidad)***

El medio SIM es un medio de cultivo semisólido, se usa para diferenciar bacilos entéricos en base a la producción de ácido sulfhídrico, indol y la movilidad, esto es posible gracias a los ingredientes con los que cuenta. Las bacterias reductoras de sulfuro producen sulfhídrico, estas al reaccionar con el amonio ferroso dan como resultado el sulfuro ferroso ( $H_2S$ ) el cual provoca la formación de un precipitado en el lugar de la punción. (ALVAREZ, M., et al. 1990, p. 21)

Para la realización de la prueba de Indol se usa el reactivo de Kovacs, este reactivo manifiesta la degradación del triptófano por la enzima triptofanasa en Indol, se combina con el aldehído

dimetil benzaldehído presente en el reactivo de Kovacs, para producir un color rojo en la superficie del medio, el cual es indicativo de una prueba positiva. Las cepas móviles pueden apreciarse en este medio por la turbidez que producen alrededor de la punción de siembra. (ALVAREZ, M., et al. 1990, p. 21)

#### **1.9.8. Citrato**

El medio citrato se utiliza para la determinar, si un microorganismo es capaz de usar el citrato como única fuente de carbono y energía. En el medio de cultivo la fuente de nitrógeno es el fosfato monoamónico y la fuente de carbono es el citrato de sodio, los dos componentes son fundamentales para el desarrollo de las bacterias. El indicador de pH es el azul de bromotimol que es el encargado de virar al medio alcalino a color azul, Las bacterias que tienen citrato permeasa son las únicas que pueden metabolizar el citrato, a través del ciclo del ácido tricarbónico, cambiando el medio a color azul. (IZURIETA, N. 2011)

#### **1.9.9. Reacción de la Ureasa**

Esta prueba es usada para determinar la capacidad de un microorganismo de hidrolizar la urea separándolas en dos moléculas de amoníaco por acción de la enzima Ureasa, además permite la diferenciación de *Proteus spp* de otro miembro de la familia *Enterobacteriaceae*. Las bacterias que tienen la enzima ureasa, usan el nitrógeno que adquieren de la urea, la hidroliza y libera el amoníaco y el CO<sub>2</sub>. Estos productos metabólicos alcalinizan el medio, provocando el viraje del indicador rojo fenol del amarillo al rojo. El medio se caracteriza por tener bajo contenido de nutrientes y elevada capacidad buffer. El extracto de levadura aporta los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano, la urea es el sustrato de la enzima ureasa y el indicador de pH es el rojo de fenol. (MacFaddin. 2003. p. 397)

#### **1.9.10. Pruebas de sensibilidad de los Cocos Gram positivos.**

La realización de la prueba de sensibilidad para Cocos Gram positivos es de gran ayuda ya que nos permite identificar la especie del microorganismo estudiado, para ellos se usó cuatro antibióticos.

- Bacitracina (0,04 U).- Se utiliza como diagnostico presuntivo en la identificación de los *Streptococcus* betahemolíticos del grupo A de lancenfield ya que a diferencia de la mayoría

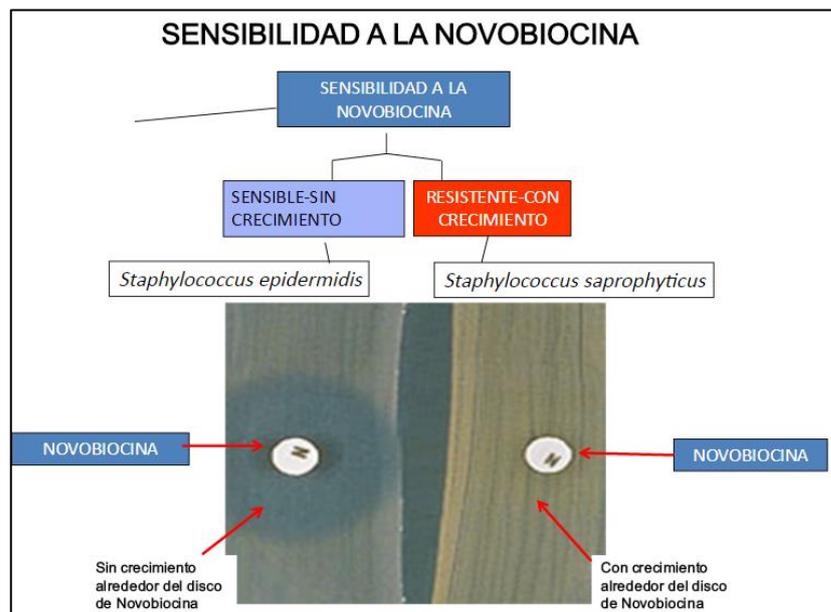
de los *Streptococcus* suelen ser sensibles a bajas concentraciones de bacitracina. (BOQUET, et al., 1995 p. 113)



**Figura 17-1:** Sensibilidad a la Bacitracina

Fuente: ARANGUEREN, Y. 2011

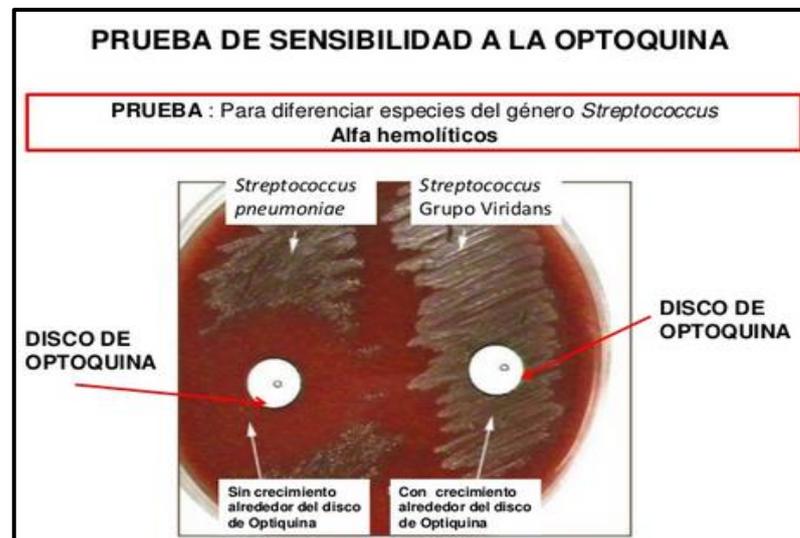
- Novobiocina.- Permite diferenciar los dos grupos de *Staphylococcus* que resultan ser coagulasa negativa, según sean sensibles o no a la Novobiocina, Los *Staphylococcus epidermidis* son sensibles a la Novobiocina mientras que el *Staphylococcus saprophyticus* no lo es. (BOQUET, et al., 1995 p. 133)



**Figura 18-1:** Sensibilidad a la Novobiocina

Fuente: ARANGUREN, Yudy, 2011

- Optoquina.- El disco de Optoquina se usa para diferenciar entre *S. pneumoniae* y otras especies de estreptococos  $\alpha$  hemolíticos. La sensibilidad a la optoquina es una medida de la fragilidad de la membrana celular bacteriana. El clorhidrato de etilhidroxicupreina inhibe el desarrollo del *Streptococcus pneumoniae*, mientras que no afecta a otros *Streptococcus* alfa hemolíticos. (BOQUET, et al., 1995 p. 133)



**Figura 19-1:** Sensibilidad a la Optoquina

Fuente: ARANGUEREN, Y. 2011

- Ácido Nalidixico.- Es un agente antimicrobiano que pertenece a la primera generación de las quinolinas. El ácido nalidixico se usa en el tratamiento de infecciones urinarias y en microbiología el disco de Ácido Nalidíxico es útil para diferenciar entre los dos grupos de *Staphylococcus* según sea su halo de inhibición, el *Staphylococcus saprophyticus* es resistente al Ácido Nalidíxico, mientras que *Staphylococcus epidermidis* no lo es. (BOQUET, et al., 1995 p. 133)

### 1.9.11. Hidrolisis del almidón

El medio de cultivo se usa para identificar microorganismos que contienen amilasa estimulando la degradación del almidón. Las moléculas de yodo están atrapadas dentro de la hélice no ramificada de unidades de glucosa de la cadena de amilosa para formar un compuesto de inclusión azul. Si la red se desintegra como ocurre durante la hidrólisis del almidón y las dextrinas por definición se produce una mezcla de dos moléculas de polisacáridos poliglucosa: amilosa lineal que solo da glucosa con la hidrólisis se denomina glucosán. La hidrólisis de almidón es analizada en medios conteniendo almidón en placa. Después de incubar se inundan

las placas con lugol que al unirse con el almidón intacto forma un complejo púrpura. (MENDEZ, L. 2012)

### ***1.9.12. Prueba de la Licuefacción de la Gelatina***

La gelatina que es una proteína derivada del colágeno animal, se incorpora a los medios de cultivo con la finalidad de determinar que microorganismos son capaces de producir enzimas proteinasas detectadas por digestión o licuefacción de la gelatina, las enzimas capaces de producir gelatinosis se denominan gelatinasas. La gelatina al ser hidrolizada por la gelatinasa en sus aminoácidos constituidos pierde sus características gelificantes. (MENDEZ, L. 2012)

## **1.10. Antibiótico**

Sustancia química que ha sido producida por un ser vivo o derivado sintético, que mata o impide el crecimiento de ciertas clases de microorganismos sensibles, fármacos usados en el tratamiento de infecciones por bacterias. Los antibióticos se utilizan para tratar infecciones provocadas por gérmenes. Normalmente los antibióticos presentan toxicidad selectiva, siendo muy superior para los organismos invasores que para los animales o los seres humanos que los hospedan. Los antibióticos generalmente ayudan a las defensas de un individuo hasta que las respuestas locales sean suficientes para controlar la infección. (WIKIPEDIA, 2016)

### ***1.10.1. Clasificación de los antibióticos.***

Los antibióticos constituyen un grupo heterogéneo de sustancias con diferente comportamiento farmacocinético y farmacodinámico, ejercen una acción específica sobre alguna estructura o función del microorganismo, tienen elevada potencia biológica actuando a bajas concentraciones y la toxicidad es selectiva, con una mínima toxicidad para las células de nuestro organismo.

- De acuerdo a la interacción germen-antibiótico.

Bactericidas: su acción es letal, llevando a la lisis bacteriana

Bacteriostáticos: las concentraciones que alcanzan en el suero o tejidos impiden el desarrollo y multiplicación bacteriana, sin llegar a destruir las células.

- Según el espectro de acción.

Amplio: cuando los antibióticos son activos sobre un amplio número de especies y géneros diferentes.

Reducido: cuando son solo activos sobre un grupo pequeño de especies.

- Según el mecanismo de acción

Mecanismos por el cual un antibiótico inhibe el crecimiento o destruye una célula bacteriana. Se dividen en inhibidores de la formación de la pared bacteriana, inhibidores de la síntesis proteica, inhibidores de la membrana citoplasmática, inhibidores de la duplicación del ADN, inhibidores de vías metabólicas.

- Según su estructura molecular.

Betalactámicos.- Son antibióticos de origen natural o semisintético que poseen en su estructura un anillo betalactámico. Inhiben la última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana, son los más utilizados en la práctica clínica y constituyen la familia más numerosa de antimicrobianos. Son compuestos de acción bactericida lenta, que no se relaciona con la concentración plasmática. Poseen un amplio margen terapéutico y baja toxicidad. Su espectro se ha ido ampliando a lo largo de los años por la incorporación de nuevas moléculas con mayor actividad frente a los bacilos gramnegativos; pero la progresiva aparición de resistencias adquiridas ha limitado su uso empírico y su eficacia en determinadas situaciones. (SEIJA, V. & VIGNOLI, R. 2006)

Penicilinas.- Son antibióticos de origen natural y semisintético que contienen el núcleo de ácido 6-aminopenicilánico, consiste en un anillo betalactámico unido a un anillo tiazolidínico. Los compuestos de origen natural son producidos por diferentes especies de *Penicillum spp.* Las penicilinas se distinguen unas de otras por relevos en la posición 6 del anillo, donde cambios en la cadena lateral pueden provocar modificaciones en la actividad antibacteriana y en las propiedades farmacocinéticas. (SEIJA, V. & VIGNOLI, R. 2006)

Cefalosporinas.- Son de origen natural derivados de productos de la fermentación del *Cephalosporium acremonium*. Tienen un núcleo constituido por ácido 7-aminocefalosporánico formado por un anillo betalactámico unido a un anillo de dihidrotiazino. La alteración en su actividad antibacteriana se debe a las modificaciones en la posición 7 del ácido 7-aminocefalosporánico y sustituciones en la posición 3 están

asociadas a alteraciones en la farmacocinética y en los parámetros metabólicos del agente. (SEIJA, V. & VIGNOLI, R. 2006)

Monobetalactámicos.- El Aztreonam es el único monobactámico disponible para uso clínico, actúa sobre bacterias gramnegativas aerobias y facultativas, carece de actividad frente a grampositivos y bacterias anaerobias. (SEIJA, V. & VIGNOLI, R. 2006)

Carbapenemes.- Son betalactámicos que presentan el mayor espectro de actividad conocido dentro de este grupo de antibióticos. Imipenem es el primer carbapenem desarrollado para uso clínico. Es un derivado semisintético producido por *Streptomyces spp.* El meropenem y ertapenem son compuestos más modernos. Su actividad bactericida se extiende a cocos Gram positivos como *Staphylococcus spp.* sensibles a meticilina, *S. pneumoniae* y otros *Streptococcus*. Solo carecen de actividad frente a los estafilococos resistentes a meticilina, enterococos resistentes a betalactámicos, algunas especies de *Pseudomonas* y *Stenotrophomonas maltophilia*. (SEIJA, V. & VIGNOLI, R. 2006)

Quinolonas.- Son un grupo de antimicrobianos que derivan de una molécula básica formada por una doble estructura de anillo que contiene un residuo N en la posición 1, son antibióticos bactericidas y actúan inhibiendo la ADN girasa, enzima que cataliza el superenrollamiento del ADN cromosómico, que asegura una adecuada división celular. (SEIJA, V. & VIGNOLI, R. 2006)

### **1.11. Resistencia antimicrobiana.**

Se entiende como resistencia antimicrobiana a la capacidad de un microorganismo de resistir los efectos de un antibiótico. Se puede producir por mutaciones producidas al azar. El antibiótico cuando está en contacto con los microorganismos permite la proliferación de aquellas bacterias que presentan aquella mutación natural que anula la acción del antibiótico. Cuando se genera la información genética el microorganismo transmite la información genética de forma horizontal por intercambio de plásmidos, integrones o transportones; o igualmente producto de una conversión lisogénica. Si una bacteria porta varios genes de resistencia, se le denomina multirresistente, informalmente, superbacteria. (WIKIPEDIA, 2016)

#### ***1.11.1 Causas de la resistencia antimicrobiana***

- ✓ Prescripción innecesaria de antibióticos para infecciones virales, contra las que no tienen ningún efecto.

- ✓ Prescripción demasiado frecuente de “antibióticos de amplio espectro” en lugar de antibióticos específicos seleccionados mediante un diagnóstico más preciso.
- ✓ Uso inadecuado por parte del paciente, al no respetar la dosis o la duración del tratamiento, permitiendo que algunas bacterias sobrevivan y se vuelvan resistentes. (GREENFACTS. 2014)

### ***1.11.2 Tipos de resistencia***

- *Natural o intrínseca.*

Es aquella que se desarrolla en forma natural es decir no hay exposición previa a antibióticos; esto implica que no todas las especies bacterianas son susceptibles naturalmente a los antimicrobianos. La resistencia se trasmite de forma vertical de generación en generación.

- *Adquirida.*

La resistencia adquirida es una característica propia de ciertas cepas, dentro de una especie bacteriana naturalmente sensible, cuya genética ha sido modificada por mutación o adquisición de genes, son evolutivas, y su frecuencia depende a menudo de la utilización de los antibióticos. La transferencia de genes se realiza horizontalmente a través de plásmidos u otro material genético móvil como integrones y transposones. De esta forma una bacteria puede adquirir la resistencia varios antibióticos sin necesidad de haber estado en contacto con estos.

### ***1.11.3 Mecanismos de resistencia***

Los mecanismos de resistencia pueden agruparse en tres categorías.

- **Remoción del Medicamento de la Célula:** Son bombas de reflujo de medicamentos dependiente de energía. Se comporta como la bomba de sodio/potasio, que actúa en contra de un gradiente de concentración, pero en este caso no intercambia electrolitos, sino que expulsa antibióticos. Los altos niveles de resistencia se deben a la sobreproducción intrínseca de estas bombas de reflujo o a la adquisición extrínseca de genes que los codifican.

- Modificaciones en el sitio blanco: esto hace que el antibiótico no reconozca el lugar de acción y así no ejerza su efecto.
- Alteraciones de la permeabilidad: se refiere a la disminución de la permeabilidad de la membrana al antibiótico. Es el mecanismo por medio del cual muchas bacterias gram negativas no permiten el paso de moléculas hidrofóbicas como la Eritromicina a través de la membrana plasmática externa, dado la presencia de lipopolisacaridos en esta. (SEIJA, V. & VIGNOLLI, R, 2008)

## **1.12. Antibiograma**

El antibiograma permite determinar la sensibilidad de una bacteria frente a diferentes antimicrobianos *in vitro* y a partir de estos resultados augura la eficacia *in vivo*. Con un antibiograma se puede determinar si la bacteria es sensible o resistente a un antibiótico siendo estos los resultados cualitativos, o cuantitativos que determinan la concentración mínima inhibitoria (CMI) de antimicrobiano que inhibe el crecimiento bacteriano. (CENDERANO, E & SAAVEDRA J. 2009 p. 1)

### ***1.12.1. Disco para antibiograma***

Los discos son fabricados en casas comerciales bajo un estricto control internacional, cada disco contiene una determinada concentración de antibiótico que permite una correlación más o menos precisa con una correlación mínima inhibitoria, que el antibiótico alcanza de manera *in vivo* según sea su resistencia o susceptibilidad (GUZMAN, M. & BERNAL M, 1984)

La conservación de los discos es muy importante ya que de ella dependen los resultados, para la conservación los recipientes deben mantenerse refrigerados de 4-5 °C o mantenerlos a - 20 °C, los discos que contienen drogas de la familia de la penicilina o de las cefalosporinas deben mantenerse siempre congelados, a excepción de una pequeña cantidad de discos que se usan diariamente, los cuales pueden mantenerse refrigerados hasta por una semana. (GUZMAN, M. & BERNAL M, 1984)

Antes de usar los discos se los debe llevar a temperatura ambiente para ponerlos en uso. Debe existir un desecante en los dispensadores de disco de susceptibilidad cuando se los coloca en el refrigerador, el mismo debe permitir permitirse que alcancen la temperatura ambiente antes de

ser utilizados. No debe usarse los discos que presenten fecha vencida, y los discos se mantendrán secos hasta que se los utilice. (GUZMAN, M. & BERNAL M, 1984)

Las técnicas de antibiogramas por difusión han sido normalizadas para microorganismos de crecimiento rápido, tales como *Staphylococcus* y *Enterobacteriaceae* pero no son confiables cuando se aplican a microorganismos de crecimiento lento, los cuales pueden mostrar zonas de inhibición mucho más grandes que aquéllos de crecimiento rápido. (GUZMAN, M. & BERNAL M, 1984)

Los discos recomendados para el antibiograma se pueden seleccionar antimicrobianos para microorganismos Gram positivos, y Gram negativos y dentro de estos últimos para microorganismos aislados de tracto urinario. El disco de Penicilina G es representativo de todas las penicilinas G. El disco de Ampicilina es representativo de todas las aminopenicilinas como: Talampicilina, Pivampicilina, Bacampicilina, Hetacilina, Amoxicilina y Epicilina. (GUZMAN, M. & BERNAL M, 1984)

El disco de Cefalotina es representativo de todas las cefalosporinas de primera generación que incluye: Cefaloridina, Cefalexina, Cefradina, Cefazolina, Cefaloglicina, Cefadroxil, Cefacetil, Cefapirina. Las cefalosporinas de segunda y tercera generación deben probarse por separado ya que no hay sensibilidad cruzada entre ellas. (GUZMAN, M. & BERNAL M, 1984)

El disco de Tetraciclina es representativo de todas las Tetracicl.inas. Los aminoglucósidos aunque íntimamente relacionados tienen variaciones individuales que obligan a probarlos individualmente. Este grupo incluye: Gentamicina, Tobramicina, Amikacina, Kanamicina, Sisomicina y Netilmicina. (GUZMAN, M. & BERNAL M, 1984)

ANTIBIOGRAMA DE DISCOS							
GUIA PARA LA SELECCION DE ANTIMICROBIANOS							
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	Tobramicina			Tetraciclina	
SEGUNDA		Ampicilina	Cefoxitina	Colistina	Gentamicina		Gentamicina
		Cloranfenicol	Cefotaxima		Netilmicina		Trimetoprim-Sulfa
		Gentamicina	Kanamicina		Vancomicina		Cloranfenicol

**Figura 20-1:** Discos para Gram positivos y Gram negativos usados en el antibiograma  
Fuente: (GUZMAN, M. & BERNAL M, 1984)

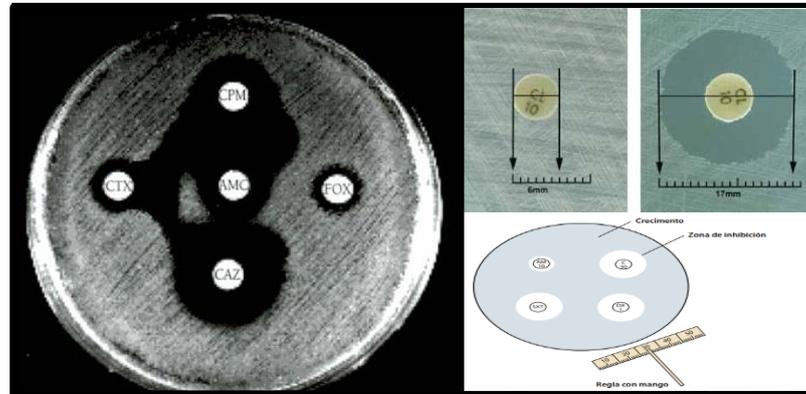
### 1.12.2. Difusión en disco.

En esta técnica se usan discos de papel impregnados con una solución de antibiótico estandarizada que se coloca sobre una superficie sólida que ha sido previamente inoculada con una suspensión bacteriana. El disco libera el antibiótico que se difunde sobre el medio sólido, generando un gradiente de concentración a su alrededor, siendo de mayor concentración las zonas más cercanas al disco y menor concentración la más lejana al disco, cuando este es superior al valor de la CMI se forma un halo inhibitorio alrededor del disco. El halo se forma en unas 18 horas de incubación y su tamaño dependerá de la sensibilidad o resistencia del microorganismo al antibiótico. (Figura 16-1) (MACFADDIN, J. pp 55-60)

### 1.12.3 Medición de los halos de inhibición

Medir la zona de inhibición de cada disco contra una superficie oscura bajo luz reflejada. Medir el diámetro de la zona incluyendo los 6 mm del disco, con una regla sobre el respaldo de la caja de Petri sin remover la tapa. Una lectura de 6 mm indica que no hay zona de inhibición. Si se ha

usado agar sangre para la prueba, la medición de la zona de inhibición debe hacerse sobre la superficie removiendo la tapa de la caja. El punto final de inhibición completa del crecimiento se estima a simple vista, excepto para las sulfonamidas y para algunas especies de *Proteus*.



**Figura 21-1:** Antibiograma por difusión con disco.

Fuente: ELLIOTT, J. 2003.

### 1.13 Bacterias encontradas en el Estudio Microbiológico

**Cuadro 9-1:** Características de las bacterias encontradas en el estudio.

GENERO	CARACTERÍSTICAS
<b>Gram Positivos</b>	
<i>Staphylococcus</i>	Cocos Gram positivas, anaerobia facultativa es decir que puede crecer tanto en atmosfera con o sin oxígeno, coagulasa y catalasa positiva, dispuestos en pares o racimos, longitud variable, crecen a una temperatura óptima de 35-37°C.
<i>Streptococcus</i>	Son bacterias acido lácticas, cocos Gram positivas, anaerobias facultativas, asociadas en parejas o cadenas, oxidasa y catalasa positiva, temperatura optima de crecimiento de 35-37°C.
<i>Micrococcus</i>	Microorganismos ubicuos, coco Gram positivos, aerobios estrictos dispuestos en parejas, tétradas o racimos, crecen bien en ambientes con poca agua o con altas concentraciones de sal, coagulasa positiva, oxidan la glucosa, temperatura optima de crecimiento de 35-37°C.
<i>Bacillus</i>	Bacilos Gram positivos aerobios y anaerobios facultativos, dispuestos en pares o cadenas producen endosporas las cuales le permiten resistir condiciones desfavorables en el ambiente,

	movilidad positiva, fermentativos u oxidativos, reducción de nitratos variables, temperatura óptima de crecimiento 35 °C.
<b>Gram Negativos</b>	
<i>Alcaligenes</i>	Bacilos Gram negativos, anaerobios facultativo oxidasa y catalasa positiva, citrato positivo, no fermentador de lactosa, temperatura optima de crecimiento 35-37°C.
<i>Brevudimonas</i>	Bacilos Gram negativos, no forman esporas, rectos, delgados, aerobios, oxidasa positivo, catalasa variable, móviles, oxidativos, temperatura óptima de crecimiento 30-37 °C.
<i>Aeromonas</i>	Bacilos Gram negativos dispuestos en pares o cadenas cortas, posee extremos redondeados, no forman esporas, anaerobios facultativos, catalasa y oxidasa positivas, movilidad variable, son fermentadores y oxidativos, temperatura óptima de crecimiento es 22-28 °C.

Fuente: MACFADDIN, 2003

## CAPÍTULO II

### 2. MARCO METODOLÓGICO

#### 2.1. Parte experimental

En este capítulo se presenta la parte experimental del trabajo de investigación realizado en el Balneario “Cununyacu” que está ubicado en las faldas noroccidentales del cerro Ilaló de la parroquia Tumbaco perteneciente a la provincia de Pichincha a una altura de 2300 m.s.n.m., el mismo tiene como objetivo investigar la microbiota del balneario para determinar su calidad sanitaria.

#### 2.2. Lugar de muestreo

El muestreo se realizó en el Balneario “Cununyacu”, se tomaron las muestras de agua de cinco puntos específicos del balneario. (Figura 1-2) El volumen recolectado de muestra fue entre 75 y 100 mL. El muestreo se realizó en dos etapas espaciados por diez días.



**Figura 1-2:** Puntos de muestreo en el Balneario “Cununyacu”  
Fuente GUALLPA S. 2016

### 2.3. Factores de Estudio

- **Población:** Agua termales.
- **Muestra:** Agua termal del Balneario Cununyacu de la Parroquia Tumbaco perteneciente a la Provincia de Pichincha.

### 2.4. Características del lugar de Investigación

La investigación de las muestras se realizó en el laboratorio de la Escuela Superior Politecnica de Chimborazo.

- **LUGAR:** Laboratorio de Análisis Bioquímico y Bacteriológico de la Facultad de Ciencias.
- **PROVINCIA:** Chimborazo
- **CANTÓN:** Riobamba

### 2.5 Materiales

**Cuadro 1-2:** Materiales de laboratorio

<ul style="list-style-type: none"><li>• Cooler</li><li>• Frascos estériles de 120mL</li><li>• Cinta masking</li><li>• Marcador permanente</li><li>• Cinta Parafilm</li><li>• Cofia</li><li>• Mascarilla</li><li>• Guantes desechables</li><li>• Mandil</li><li>• Asa de vidrio</li><li>• Asa de platino</li><li>• Pipeta automática de 20,100,1000uL</li><li>• Puntas azules</li><li>• Puntas amarillas</li><li>• Mechero de alcohol</li><li>• Cajas Petri</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Probeta de 250 mL</li><li>• Erlenmeyer de 500, 250, 150 mL</li><li>• Varillas de agitación</li><li>• Vasos de precipitación de 250 y 150 mL</li><li>• Pera</li><li>• Malla metálica</li><li>• Reverbero eléctrico</li><li>• Placas portaobjetos</li><li>• Aceite de inmersión</li><li>• Lápiz graso</li><li>• Palillo e hisopos</li><li>• Papel bon A4</li><li>• Tubos y corchos</li><li>• Gradillas</li><li>• Goteros</li></ul>
--	--

<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tiras indicadoras de pH</li> <li>• Termómetro</li> <li>• Frascos de vidrio</li> <li>• Cinta testigo de esterilización</li> <li>• Fundas de tela</li> <li>• Fundas rojas</li> <li>• Cámara fotográfica</li> <li>• Regla</li> <li>• Algodón</li> <li>• Gasa</li> <li>• Papel aluminio</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vaselina sin aroma</li> <li>• Pipetas graduadas de 10 mL</li> <li>• Piceta</li> <li>• Espátula</li> <li>• Tubos tapa lila</li> <li>• Tiras de oxidasa</li> <li>• Pinza punta plana</li> <li>• Libreta de apuntes</li> <li>• Alcohol</li> <li>• Discos de sensibilidad</li> <li>• Pipeta Pasteur</li> <li>• Tijera</li> </ul>
---	---

Realizado por: GUALLPA S. 2016

#### **Cuadro 2-2: Equipos de laboratorio**

<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cámara de flujo laminar (NUAIRE)</li> <li>• Estufa bacteriológica (MEMMERT)</li> <li>• Autoclave (TUTTNAUER)</li> <li>• Microscopio</li> <li>• Refrigeradora</li> <li>• Balanza analítica</li> </ul>
---

Realizado por: GUALLPA S. 2016

#### **Cuadro 3-2: Reactivos**

<ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua destilada</li> <li>• Cloruro mercuríco</li> <li>• Kovac´s</li> <li>• Agua oxigenada</li> <li>• Suero fisiológico</li> </ul> <p>Kit de tinción Gram</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Cristal violeta</li> <li>• Lugol</li> <li>• Alcohol-cetona</li> <li>• Safranina</li> </ul>
--

Realizado por: GUALLPA S. 2016

#### **Cuadro 4-2: Medio de cultivo**

- Placas 3M Petrifilm™ Aerobios totales
- Placas 3M Petrifilm™ *E. coli*- Coliformes
- Placas 3M Petrifilm™ Mohos y Levaduras
- Placas 3M Petrifilm™ *Staph* Express
- Agar Hugh-Leifson O-F
- Agar Almidón (MERCK)
- Agar Gelatina (MERCK)
- Agar Eosina Azul de Metileno (MERCK)
- Agar MacConkey
- Agar Manitol Salado (ACUMEDIA)
- Agar Hierro de Kligler (MERCK)
- Agar Salmonella-Shigella (MERCK)
- Medio SIM (MERCK)
- Agar Urea (MERCK)
- Agar Citrato de Simmons (MERCK)
- Agar Base Sangre (ACUMEDIA)
- Plasma sanguíneo

Realizado por: GUALLPA S. 2016

## **2.6. Métodos**

### **2.6.1. Muestreo**

Se tomó la muestra del agua termal del Balneario “Cununyacu” en cinco lugares(Figura 1-2), la primera muestra tomada fue en donde emerge el agua, la segunda muestra fue recolectada de los tubos por donde se transporta el agua hacia el reservorio, ambos sitios se encuentran ubicado en la parte posterior del balneario, la tercera muestra se recolecto de uno de los reservorios ubicado cerca de las piscinas, la cuarta y la quinta muestra se recolecto de la piscina grande y de la piscina pequeña respectivamente, ubicadas en la parte baja del balneario. Los muestreos se realizaron en dos etapas espaciados por 10 días, siendo el primero muestreo el 28 de Abril con una temperatura ambiente de 18 °C y el segundo muestreo el 8 de Mayo con una temperatura ambiente de 22°C. (NTE INEN 2169:98, 2013)

#### *2.6.1.1. Toma de la muestra*

La recolección se hizo usando guates limpios para no contaminar el agua. Para la toma de muestra se utilizaron frasco estériles de plástico, se tomó la muestra procurando que esta sea representativa, se llenó las  $\frac{3}{4}$  partes del recipiente para ser más fácil su homogenización. Se sujetó el frasco cerca de la base, se retiró la tapa cuidando de no tocar su boca, se colocó el frasco a contra corriente del agua, se efectuaron tres lavadas con la misma agua antes de recoger la muestra definitiva, se tapó el recipiente rápidamente, se selló con parafilm y finalmente se codifico la muestra, el mismo proceso se efectuó en los cinco lugares escogidos (Figura 1-2) (NTE INEN 2176:2013)

#### *2.6.2 Análisis Físico-Químico*

Esta prueba se realizó *in situ* con ayuda de un termómetro de mercurio y las tiras indicadoras de pH, se procedió a la toma de la temperatura ambiente, de la temperatura y pH del agua de cada uno de los sitios en donde se recolectaron las muestras.

#### *2.6.3 Conservación y transporte de las muestras*

El transporte de las muestras se realizó en un cooler, el cual nos ayudó a que las muestras no se vean afectadas por la luz, el aire etc., y a temperatura ambiente, las mismas que se trasladaron al Laboratorio de Análisis Bioquímicos y Bacteriológicos de la Facultad de Ciencias para realizar el análisis microbiológico. (NTE INEN 2169:98:2013)

#### *2.6.4 Análisis Microbiológico*

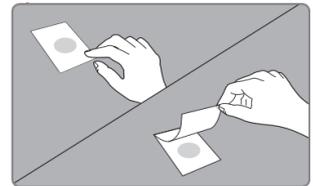
Una vez transportada la muestra al laboratorio, se procede a realizar el análisis asegurándose de mantener la asepsia, para lo cual se trabajó siempre en la cámara de flujo laminar la cual se desinfecto colocando por 30 minutos la luz UV.

#### 2.6.4.1 Siembra de microorganismos en placas Petrifilm<sup>3M</sup> Petrifilm<sup>TM</sup>

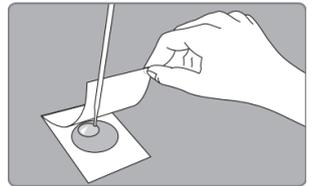
La siembra de la muestra de agua se realizó dentro de la cámara de flujo laminar, en una superficie plana en Placas 3M Petrifilm<sup>TM</sup> específico para cada microorganismo, como son: *aerobios mesofilos*, *E. coli/coliformes*, *Staphylococcus aureus*, *mohos* y *levaduras*. Cada placa fue codificada con el número correspondiente del sitio de la muestra.

#### 2.6.4.2 Técnica de Petrifilm<sup>TM</sup> según 3MTM 2009

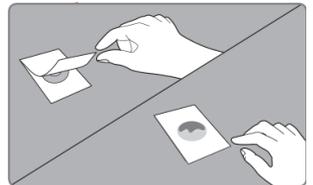
1. Disponer la placa Petrifilm en una superficie plana y levantar el film superior.



2. Pipetear 1 ml de la muestra y colocarla en el centro del film inferior. Mantener la pipeta en posición vertical. No tocar el film inferior mientras se pipetea.



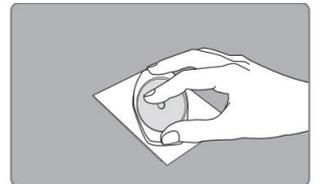
3. Bajar el film superior cuidadosamente, sin dejarlo caer bruscamente, para que no se formen burbujas de aire.



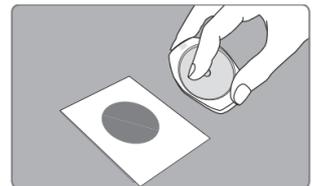
4. Colocar el aplicador en el film superior sobre el inóculo con la cara lisa hacia abajo.



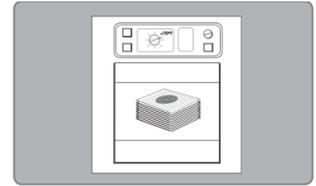
5. Aplicar presión sobre el aplicador para distribuir la muestra por toda la zona circular.



6. Levantar el aplicador y esperar 1 minuto hasta que se solidifique el gel.



7. Incubar las placas Petrifilm cara arriba en grupos de no más de 20 placas, *Aerobios mesófilos*, *E.coli/coliformes*, *Staphylococcus aureus*, a 35°C±1°C de 24 a 48 horas y *mohos y levaduras* a 25-28 °C durante 5 días.



#### 2.6.4.3 Siembra de microorganismos en cajas Petri de Eosina Azul de Metileno y Manitol Salado.

- La siembra de la muestra de agua del balneario se realizó en el interior de la cámara de flujo laminar previamente esterilizada.
- Con ayuda de pipetas y de puntas amarillas y azules previamente esterilizadas se procedió
- sembrar dos volúmenes distintos en el medio Eosina Azul de Metileno que fueron de 100 µL y 20µL respectivamente.
- Una vez añadida la muestra en el agar se procedió al extendido de ella con la ayuda del aza de vidrio que fue esterilizada mediante flameado en el mechero.
- El mismo procedimiento se efectuó en todas las muestras de agua, se incubó a una temperatura de 35 °C por 24 horas.

Finalizado el tiempo de incubación se procede a realizar el conteo de los microorganismos presentes en las placas Petrifilm y en las cajas Petri, los resultados que se obtuvieron fueron expresados como Unidades Formadoras de Colonia (UFC/mL)

#### 2.6.5. Descripción macroscópica de las colonias

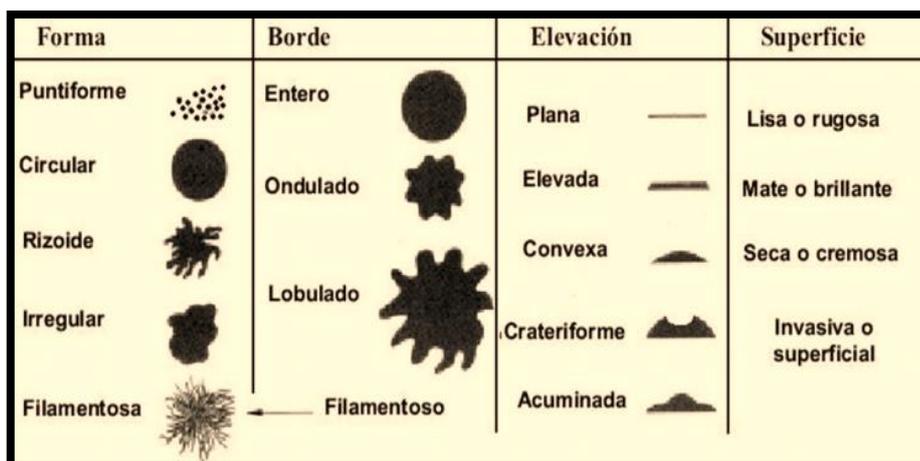
Según Marín R. et al. 2003 define a las colonias como una agrupación de bacterias formadas a partir de la reproducción de una Unidad Formadora de Colonia sobre un medio de cultivo sólido; son de diferente tamaño pero es visible a simple vista.

La descripción de las colonias se realiza a simple vista y se anota todas las características de cada clon como son:

**Cuadro 5-2:** Características macroscópicas de aislados bacterianos

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

Fuente: Díaz, 2010



**Figura 2-2:** Morfología de las colonias bacterianas

Fuente: (Stanchi N. O., et al 2007)

## 2.6.6 Preparación de medios de cultivo

2.6.6.1. *Agar Mueller –Hinton, Sangre, Eosina Azul de Metileno, Manitol Salado, MacConkey, Salmonella shigella, Agar Almidón, Agra Gelatina.*

- Se pesó en papel aluminio cierta cantidad de agar según lo indicado en la técnica de cada medio.
- Se colocó el agar en un matraz y se disolvió en cierta cantidad de agua destilada según lo requerido en cada medio.

- Luego se calentó el agar en un reverbero hasta ebullición, esto ayudó a que el medio tenga una completa dilución.
- El boca del matraz fue sellado con un corcho hecho de algodón y gasa, este ayudo a que el medio no tenga contacto con el ambiente y pueda contaminarse.
- Posteriormente se esterilizo el medio de cultivo en la autoclave a una temperatura de 121 ° C por 25 minutos.
- Finalizada la esterilización se dejó enfriar el medio hasta que alcance una temperatura de 45-50°C aproximadamente.
- En el interior de la cámara de flujo laminar se distribuyó el medio en cajas Petri estériles.
- En el caso del Agar sangre antes de distribuir el medio se procedió a extraer sangre de un voluntario y se vertió cuidadosamente por las paredes (5% en cada 100mL) mezclamos y procedemos a distribuir en las cajas.
- Finalmente se dejó en reposo el medio de cultivo hasta que este se solidifique totalmente.

#### 2.6.6.2 Preparación de Agar Kligler, SIM, Urea y citrato de Simmons

- Se pesó en papel aluminio cierta cantidad de agar según lo indicado en la técnica de cada medio.
- Se colocó el agar en un matraz y se disolvió en cierta cantidad de agua destilada según lo requerido en cada medio.
- Luego se calentó el agar en un reverbero hasta ebullición, esto ayudó a que el medio tenga una completa dilución.
- El boca del matraz fue sellado con un corcho hecho de algodón y gasa, este ayudo a que el medio no tenga contacto con el ambiente y pueda contaminarse.
- Posteriormente se esterilizo el medio de cultivo en la autoclave a una temperatura de 121 ° C por 25 minutos.
- Finalizada la esterilización se dejó enfriar el medio hasta que alcance una temperatura de 45-50°C aproximadamente.
- En la cámara de flujo laminar antes de distribuir el Agar Urea se colocó el reactivo de Urea al 40 % en el medio de cultivo.
- Se distribuyó los medios en tubos de vidrio estériles a razón de 4 mL y se dejó solidificar en posición inclinada o pico de flauta, a excepción del medio SIM, que se colocó en posición vertical.

#### 2.6.6.3. Reactivo cloruro mercúrico

- El reactivo cloruro mercúrico se preparó disolviendo el cloruro mercúrico en agua destilada que fue esterilizada con anterioridad.
- Se colocó el ácido clorhídrico lentamente y agitando constantemente hasta que todo se haya disuelto.
- Finalmente se guardó en recipientes estériles tapados para evitar cualquier contaminación hasta el momento de su uso.

#### 2.6.6.4. Agar Hugh- Leifson

- Con ayuda de la balanza se pesó en papel aluminio una determinada cantidad de agar *Hugh-Leifson*.
- Se colocó el medio en un matraz y se agregó cierta cantidad de glucosa.
- Se disolvió en agua destilada y se calentó hasta ebullición para una completa dilución.
- Se esterilizo en la autoclave a una temperatura de 121 °C por 25 minutos.
- Finalizada la esterilización se dejó enfriar el medio hasta que alcanzara una temperatura de 45 a 40 °C aproximadamente.
- En el interior de la cámara de flujo laminar se distribuyó en cada tubo estéril una cantidad de 7ml y se dejó enfriar el medio con los tubos en posición vertical.

#### 2.6.7. Estabilización del aislado bacteriano

De cada placa de Petrifilm™ que fue sembrada (*aerobios mesofilos*, *E.coli/coliformes*, *Staphylococcus aureus*) se escoge al menos un representante de cada tipo de colonias, la más llamativa, la que creció primero o que tienen mayor tamaño. Se preparó el Agar Mueller Hinton para poder realizar el aislado, en el fondo de la placa se procedió a dibujar una cuadrícula para inocular en cada cuadro la colonia seleccionada anteriormente, se incubo a 37°C por 24 horas.

Se logró estabilizar el aislado con 4 y 5 repiques hasta que se obtuvo un crecimiento continuo de las colonias el proceso se efectuó dentro de la cámara de flujo laminar para evitar que exista contaminación.

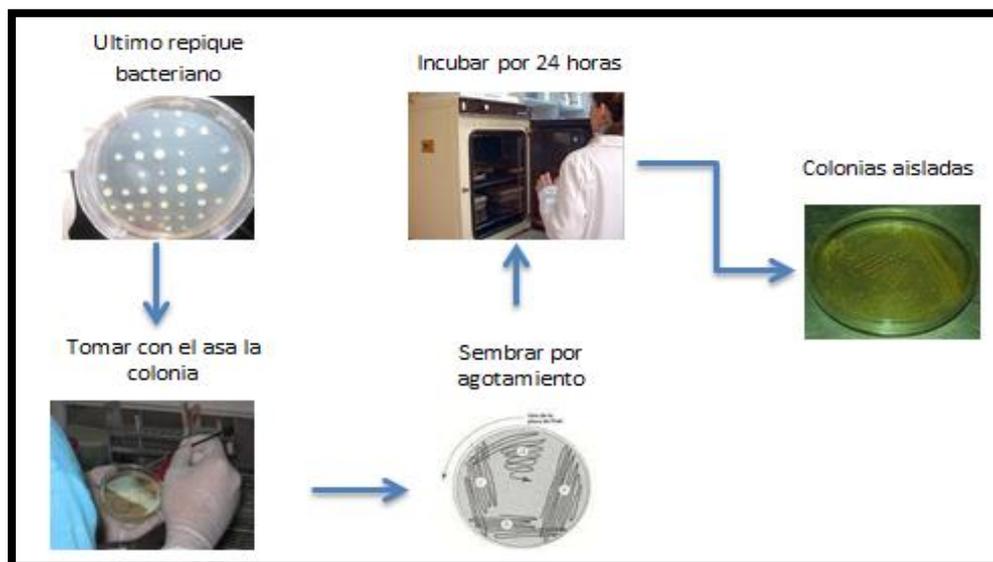
### 2.6.8 Realización de repiques.

El repique consiste en transferir el microorganismo que se encuentra en el medio Mueller Hinton a otro medio de cultivo Mueller Hinton, con ayuda de un palillo estéril. Para esto se tocó la colonia con el palillo y posteriormente se tocó el medio de cultivo, esto ayudara a que las colonias se aíslen y permitirá mantenerlas frescas para un próximo repique.

### 2.6.9 Siembras por agotamiento para la obtención de cepas puras.

Luego del último repique para la estabilización bacteriana se procedió a realizar la siembra por agotamiento en el medio de cultivo Mueller Hinton, codificamos la caja y sembramos de la siguiente manera:

Con la ayuda del asa de platino previamente estéril, se repartió desde el extremo superior de la caja sobre el medio de cultivo hasta la  $\frac{3}{4}$  del agar, se flameó la asa, se giró la caja y a partir de la última estría se cogió la muestra para volver a estriar, esta operación se realizó 4 veces. El recorrido de la asa debe ser largo, con el fin de obtener al final del mismo colonias aisladas. se incubó la caja en posición invertida a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 horas, pasado ese tiempo se puede notar que el primer estriado aparece una masa continua de microorganismo, en la cual no se distingue las colonias, sin embargo en el último estriado se puede notar colonias aisladas, permitiéndonos diferenciar el tamaño, el color y la forma del cultivo. A estas colonias aisladas se procedió a realizar la tinción Gram para comprobar su estabilización.



**Figura 3-2:** Siembra por agotamiento

Realizado por: GUALLEPA, S. 2016

### ***2.6.10 Tinción Gram de las colonias que se obtuvieron por agotamiento.***

La determinación de las bacterias Gram positivas y Gram negativas se realizó mediante el método de tinción Gram, la misma nos ayudara a tener una idea clara de la morfología de las bacterias que estudiamos.

#### **Procedimiento**

- En una placa porta objeto desengrasada y codificada, se colocó una gota de suero fisiológico.
- Con ayuda de un palillo estéril, se tomó una pequeña muestra de la colonia y se diluyó en la solución, la cual fue fijada al calor.
- Se recubrió la extensión con cristal violeta por un minuto, luego se enjuagó con agua corriente cuidando que no se arrastre la preparación.
- Se añadió a la extensión gotas de lugol, se esperó un minuto y se procedió a retirar el exceso con agua corriente.
- Se recubrió la extensión con unas gotas de alcohol-cetona, se esperó 30 segundos y se enjuagó la placa con agua corriente.
- Se aplicó unas gotas de safranina en la extensión, se esperó un minuto y se enjuagó con agua corriente.
- Se dejó secar la placa a temperatura ambiente.
- Finalmente se colocó una gota de aceite de inmersión sobre el extendido y se observó en el microscopio con el lente 100X. (SAMTAMBROSIO, 2009, pp. 2-5)



**Figura 4-2:** Tinción Gram, observación en el microscopio  
**Fuente:** GUALLPA, S. 2016

### 2.6.11 Identificación bacteriana de las colonias aisladas.

Los clones aislados tienen que pasar por una serie de pruebas para su posterior identificación.

#### 2.6.11.1 Método de la Prueba de Catalasa

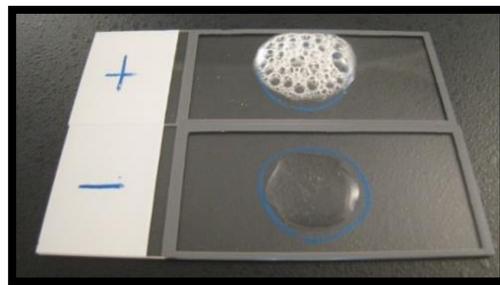
La enzima catalasa se manifiesta en mayor proporción en las bacterias aerobias. Su función es separar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, además ayuda a la diferenciación de miembros de la familia *Micrococaceae* de la familia *Streptococcaceae*. (BEJAR, V., et al. 2015)

#### Procedimiento

- Con la ayuda de un palillo estéril se tomó una pequeña cantidad de colonia bacteriana y se colocó en la superficie de la placa porta objeto previamente desengrasada y codificada.
- Se colocó una gota de (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al 3% sobre la colonia.

Interpretación de los resultados:

- Si existe producción rápida de burbujas, a esta se le interpretó como prueba positiva.
- Si no se da la producción de burbujas, la prueba será negativa. (Figura 5-2)



**Figura 5-2:** Prueba Bioquímica de la Catalasa  
Fuente: IZURIETA, N. 2011

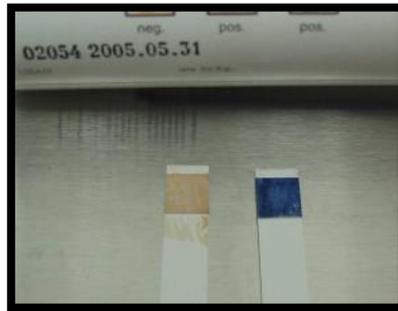
#### 2.6.11.2 Método de la Prueba de Oxidasa

La prueba Oxidasa comprueba la presencia del citocromo C, el cual se oxida cuando reacciona con la N<sup>1</sup>, tetrametil, 1-4, fenilendiamina. La oxidación se detecta con un cambio de color de la tira. (BEJAR, V., et al. 2015)

- Se procedió a humedecer la tira reactiva de oxidasa con agua destilada estéril.
- Se tomó con ayuda de un palillo estéril una pequeña cantidad de la colonia y se suspendió en la tira de oxidasa.

Interpretación de los resultados:

- La presencia de un color azul intenso fue interpretada como positiva.
- Si no presenta color, la prueba es negativa. (Figura 6-2)



**Figura 6-2:** Prueba Bioquímica de la Oxidasa  
**Fuente:** IZURIETA, N. 2011

## **2.6.12. Identificación de Cocos Gram positivos**

### **2.6.12.1. Método de la Prueba de Coagulasa en plasma**

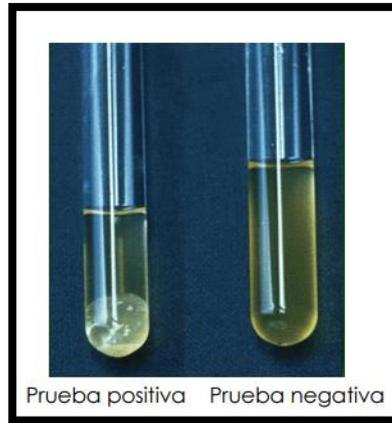
Esta prueba consiste en poner de manifiesto la enzima coagulasa que posee algunos *Staphylococcus*. (BOQUET, et. al., 1995, pp. 44-148)

#### **Procedimiento**

- Para la realización de esta prueba, se hizo uso de plasma humano.
- Se extrajo sangre en tubos color violeta, el cual contiene EDTA que es un anticoagulante el cual nos permitió mantener líquida la sangre.
- Procedimos a centrifugar la sangre a 3000 r/min, por 5 minutos.
- Transcurrido el tiempo necesario, retiramos los tubos de la centrifuga y con ayuda de una pipeta y puntas estériles separamos el plasma de los elementos formes.
- Una vez obtenido el plasma, distribuimos 0,5 mL en tubos estériles.
- En el interior de la cámara de flujo laminar y con ayuda de hisopos previamente esterilizados procedimos a tomar una pequeña cantidad de colonia y la homogenizamos en el plasma sanguíneo, esto se realizó con todas las colonias puras obtenidas.
- Finalmente se incubó a 35-37 °C por 24 horas

Interpretación de los resultados:

- Se considera como prueba positiva cuando la muestra se gelifica, caso contrario será negativa. (Figura 7-2)



**Figura 7-2:** Prueba Bioquímica de la Coagulasa

**Fuente:** IZURIETA 2011

#### 2.6.12.2. Método de la Prueba de NaCl 6,5%

Capacidad de algunos microorganismos de desarrollarse en medios de cultivo con concentraciones de cloruro.

Procedimiento

- Con ayuda de una pipeta y puntas de color azul procedimos a colocar 1000  $\mu$ L en tubos que fueron esterilizados conjuntamente con las puntas.
- Tomamos una pequeña cantidad de colonia con un hisopo estéril y procedimos a homogenizar la muestra en el NaCl 6,5%.
- Incubamos a 37 °C por 24 horas.
- Finalmente después de transcurrido el tiempo de incubación se observaron los cambios ocurrido.

Interpretación de los resultados:

- Se considera positiva cuando da un viraje de color del purpura al amarillo.
- Si no hay turbidez la prueba se considera negativa.

### 2.6.12.3. Método de siembra en Agar Manitol Salado

Permite el crecimiento de bacterias Gram positivas e inhibe el crecimiento de las Gram negativas.

Procedimiento:

- Con ayuda de un asa de platino previamente esterilizada, se tomó una pequeña cantidad de colonias del Agar Miuller Hinton y se inoculo en la placa de agar manitol mediante estría.
- Se incubo en la estufa a 35°C durante 24 horas.
- Este procedimiento se realizó con todas las muestras puras y en el interior de la cámara de flujo laminar evitando posibles contaminaciones.

Interpretación de los resultados:

- Microorganismo fermentador del manitol cuando existe el crecimiento de colonias amarillas que pueden estar acompañadas o no de un halo.
- Colonias de color del medio que pueden estar acompañadas de un halo rojizo- purpura son microorganismos que no fermentan manitol. (Figura 8-2)



**Figura 8-2:** Fermentación de Agar Manitol.  
**Fuente:** Manchester Metropolitan University.

### 2.6.12.4. Método de siembra en Agar Base Sangre

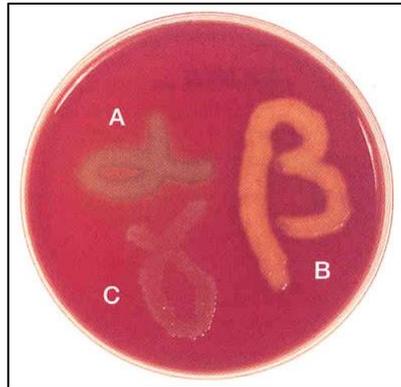
Los microorganismos cuando se cultivan in-vitro sobre medios que contienen sangre pueden producir alrededor de las colonias unas zonas de hemólisis.

Procedimiento:

- En la cámara de flujo laminar y con la ayuda del asa de platino previamente esterilizada, se tomó una pequeña muestra de colonia.
- Se realizó un estriado en la placa y se incubó a 35 °C durante 24 horas.
- Trascurrido el tiempo de incubación se observó la hemólisis que posee.

Interpretación de los resultados:

- Si se observan halos verdosos la hemólisis será alfa ( $\alpha$ ).
- Si se observan halos incoloros la hemólisis será beta ( $\beta$ ).
- La inexistencia de halos en el medio de cultivo, la hemólisis será gamma ( $\gamma$ ). (Figura 9-2)



**Figura 9-2:** Hemólisis en Agar Sangre.

Fuente: microBIO. 2016

#### 2.6.13 Prueba de sensibilidad a Cocos Gram positivos.

- La prueba consiste en inocular la superficie de una placa de Mueller Hinton, con una suspensión de microorganismo análoga a la utilizada en los antibiogramas.
- Asegurarse de pasar el hisopo con la suspensión problema por toda la superficie de la placa.
- Dejar reposar por 5 minutos a una temperatura ambiente.
- Añadir con una pinza estéril el disco (Optoquina, Novobiocina, Acido Nalidíxico, Bacitracina) presionándolo para favorecer su contacto con el medio.
- Incubar a 35 °C durante 18 a 24 horas.

Interpretación de los resultados:

- La prueba de sensibilidad a la Bacitracina, se considera sensible cuando existe inhibición del desarrollo bacteriano alrededor del disco, la prueba será negativa cuando no se observa inhibición.
- La prueba de sensibilidad a la Novobiocina y Acido Nalidíxico se considera sensible cuando alrededor del disco se observa un halo de inhibición superior a 16 mm, esto es indicativo de que el microorganismo es *Staphylococcus epidermidis*.
- La prueba de sensibilidad a la Optoquina, se considera sensible cuando alrededor del disco se observa un halo de inhibición superior a 15 mm, el crecimiento de *Streptococcus pneumoniae* queda inhibido. Los demás *Streptococcus*  $\alpha$  hemolíticos no presentan ningún tipo de inhibición o sus halos son inferiores a 15 mm. (BOQUET, et. al., 1995, pp.113-134)



**Fotografía 1-2:** Prueba de sensibilidad a Cocos Gram Positivos

Fuente: GUALLPA S. 2016

#### **2.6.14 Identificación de Bacilos Gram Positivos**

##### **2.6.14.1 Método de siembra en Agar Almidón.**

Esta prueba determina la capacidad de algunas bacterias para elaborar la enzima amilasa la cual hidroliza el almidón. (BOQUET, et. al., 1995, p. 112)

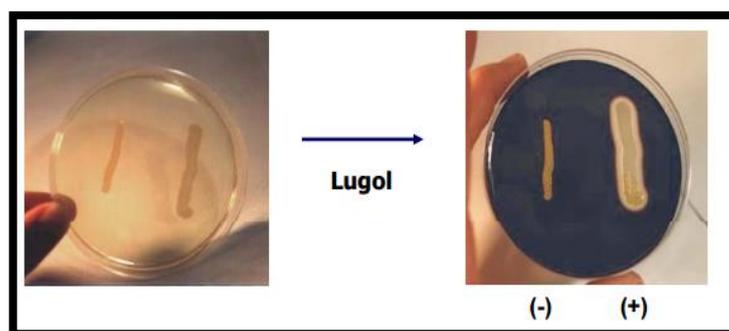
Procedimiento:

- En la cámara de flujo laminar y con la ayuda del asa de platino previamente esterilizada, se tomó una pequeña muestra de colonia.
- Se realizó un estriado en la placa y se incubó a 35 °C durante 48 horas.

- Transcurrida la incubación se cubrió la placa con reactivo de lugol.

Interpretación de los resultados:

- La prueba es positiva cuando al aplicar el reactivo de lugol en la colonia se forma un halo transparente, esto indicativo de que existió la hidrólisis del almidón.
- La prueba es negativa cuando el medio se torna de color azul al aplicarse el reactivo de lugol, indicando que no existe hidrólisis del almidón.



**Figura 10-2:** Prueba Hidrólisis del Almidón  
Fuente: IZURIETA, N. 2011

#### 2.6.14.2 Método de siembra en Agar Gelatina

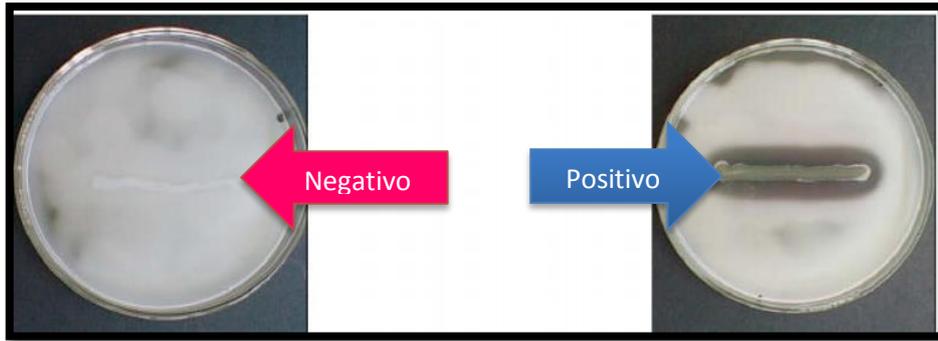
Esta prueba se usa para determinar la capacidad de ciertos microorganismos de hidrolizar la gelatina a péptidos y aminoácidos, mediante la enzima específica gelatinasa. (BOQUET, et. al., 1995, p 118)

Procedimiento:

- En la cámara de flujo laminar y con la ayuda del asa de platino previamente esterilizada, se tomó una pequeña muestra de colonia.
- Se realizó un estriado en la placa y se incubó a 22-25 °C durante 48 horas.
- La lectura se realizó agregando a la placa el reactivo cloruro mercúrico.
- Para la realización de la lectura se cubrió la placa con el reactivo precipitante de proteínas HCl observándose que se formó un precipitado blanco en la paca.

Interpretación de los resultados:

- La prueba es positiva cuando hay ausencia del precipitado blanco lo cual indica que la gelatina no se hidroliza.
- La prueba es negativa cuando se observa un precipitado blanco lo cual indica que la gelatina no se hidroliza.



**Figura 11-2:** Prueba Hidrólisis de Gelatina

Fuente: IZURIETA, N. 2011

#### 2.6.14.3 Método de siembra en Agar E.M.B.

Es un medio selectivo que permite aislar bacilos Gram negativos, especialmente las especies de la familia *Enterobacteriaceae*. (E.M.B AGAR, 2010)

Procedimiento:

- En la cámara de flujo laminar y con la ayuda del asa de platino previamente esterilizada, se tomó una pequeña muestra de colonia del Agar Muelles Hinton..
- Se realizó un estriado en la superficie del medio y se incubó a 35 °C durante 24 horas.
- Finalmente se procedió a realizar las lecturas.
- Interpretación de los resultados:
- Si las colonias presentan un color negro azulado o amarronado, que pueden tener centro oscuro y brillo metálico el microorganismo aera *Echerichia coli*.
- Las colonias presentan el mismo color del medio de cultivo, puede tratarse de cualquier otro microorganismo. (E.M.B AGAR, 2010 p.1)



**Figura 12-2:** Crecimiento en Eosina Azul de Metileno

Fuente: Guillaume, 2006

#### 2.6.14.4 Método de siembra en Agar MacConkey

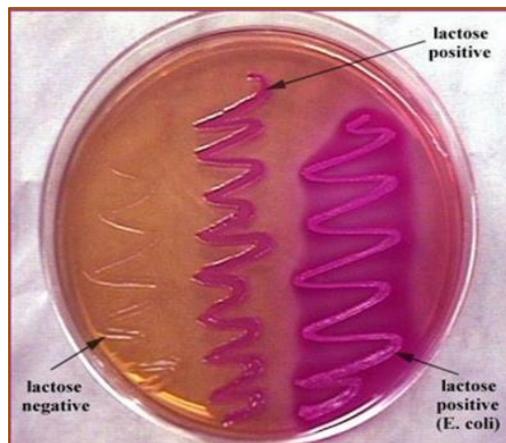
Este medio se usa para aislar bacilos Gram (-) de fácil crecimiento aerobios y anaerobios, especialmente los de la familia *Enterobacteriaceae*. (MAC KONKEY AGAR, 2015)

Procedimiento:

- En la cámara de flujo laminar y con la ayuda del asa de platino previamente esterilizada, se tomó una pequeña muestra de colonia del Agar Muelles Hinton.
- Se realizó un estriado en la superficie del medio y se incubó a 35 °C durante 24 horas.
- Finalmente se procedió a realizar las lecturas.

Interpretación de los resultados:

- Si los microorganismos son fermentadores de lactosa, en el medio se observaron colonias rosadas-rojizas.
- Si los microorganismos no son fermentadores de lactosa, en el medio se observaron colonias del color del medio y transparentes. (MAC KONKEY AGAR, 2015)
- 



**Figura 13-2:** Crecimiento en Agar MacConkey  
Fuente: MicrobeWORLD 2015

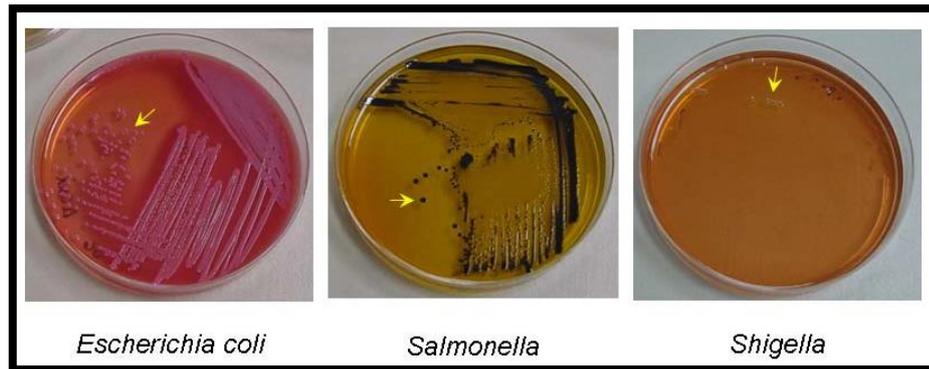
#### 2.6.14.5 Método de siembra en Agar Salmonella Shigella

Procedimiento:

- En la cámara de flujo laminar y con la ayuda del asa de platino previamente esterilizada, se tomó una pequeña muestra de colonia del Agar Muelles Hinton.
- Se realizó un estriado en la superficie del medio y se incubó a 35 °C durante 24 horas.
- Finalmente se procedió a realizar las lecturas.

Interpretación de los resultados:

- Cuando los microorganismos son fermentador de lactosa existe crecimiento y las colonias se presentan de color rosadas o rojizas.
- Microorganismos no fermentadores de lactosa las colonias son incoloras, es decir presentan el color del medio.
- Colonias productoras de H<sub>2</sub>S, las colonias presentaran un centro negro. (Figura 14-2) (SALMONELLA-SHIGELLA., 2010)



**Figura 14-2:** Crecimiento de colonias en Agar Salmonella Shigella  
Fuente: MICROBIOLOGY, 2016.

#### 2.6.14.6 Método de inoculación en el Medio Hugh Leifson (O.F.)

Este medio se usa como una prueba bioquímica bacteriana, para saber el metabolismo oxidativo-fermentativo de las bacterias (O.F. MEDIO BASAL DE HUGH & LEIFSON. 2010)

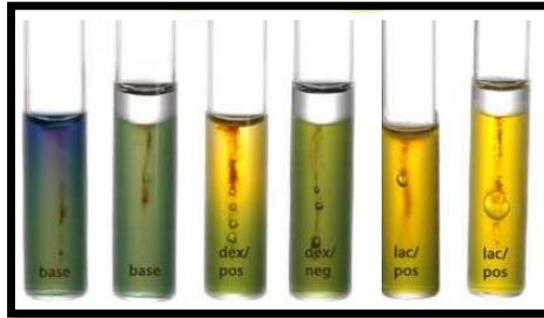
Procedimiento:

- En el interior de la cámara de flujo laminar y con la ayuda de la aguja del asa previamente esterilizada, se tomó una pequeña muestra de la colonia y se sembró por picadura en línea recta en los tubos que contienen el medio.
- En uno de los tubos se añadió 1 mL de vaselina estéril para incubar en un ambiente de anaerobiosis.
- El otro tubo quedo expuesto al aire (aerobiosis)
- Se incubaron a 35 °C por 15 días, de los cuales se iba realizando las lecturas diariamente para observar los cambios.

Interpretación de los resultados:

- Cambio de color del tubo sin vaselina “abierto” de verde a amarillo, es indicativo de indica que existen microorganismos oxidativos del hidrato de carbono.

- Cuando ambos tubos cambian de color de verde a amarillo indica que existen microorganismos fermentadores del hidrato de carbono.
- Cuando no se da el cambio de color en ninguno de los tubos permaneciendo verdes, indica que los microorganismos no utilizan el hidrato de carbono. (Figura 15-2) (O.F. MEDIO BASAL DE HUGH & LEIFSON. 2010)



**Figura 15-2:** Prueba de Hugh y Leifson  
Fuente: IZURIETA, N. 2011

### 2.6.15 Pruebas bioquímicas

#### 2.6.15.1 Método de inoculación en el Medio Kligler

Determina el microorganismo fermentador de glucosa y lactosa. (KLIGLER HIERRO AGAR., 2010)

Procedimiento:

- En el interior de la cámara de flujo laminar y con la aguja del asa previamente esterilizada se tomó una pequeña cantidad de colonia y se estrió en zic-zac en el pico de flauta.
- Se incubo a 35 °C durante 24 horas en aerobiosis.

Interpretación de los resultados:

- Fermenta glucosa cuando el fondo del tubo presenta una coloración amarilla.
- Fermenta lactosa cuando el cambio de color a amarillo fue en el pico de flauta.
- Si se efectúa un cambio de color en todo el tubo, esto nos indicó que en el medio fermentaron los dos azúcares, tanto glucosa como lactosa.
- Cuando el medio mantiene su color original que es rojizo, esto indica que la prueba es negativa, no hay producción de ningún azúcar.

- La presencia de gas se pudo evidenciar cuando en el medio hay la aparición de burbujas o elevación de agar.
- La producción de H<sub>2</sub>S, se evidencia cuando el medio presenta una coloración negra. (Figura 16-2) (KLIGLER HIERRO AGAR., 2010)



**Figura 16-2:** Prueba Bioquímica en Agar hierro de Kligler (KIA)

Fuente: Izurieta, 2011

#### 2.6.15.2 Método de inoculación en Urea

Este medio determina la capacidad que tiene un organismo de hidrolizar la urea en CO<sub>2</sub> y amoníaco por acción de la ureasa. (BOQUET, et. al., 1995, p. 142)

Procedimiento:

- En el interior de la cámara de flujo laminar y con la aguja del asa previamente esterilizada se tomó una pequeña cantidad de colonia y se estrió en zic-zac en el pico de flauta.
- Se incubo a 35 °C durante 24 horas en aerobiosis.

Interpretación de los resultados:

- Se considera como prueba positiva cuando la coloración del medio toma una tonalidad rosada ya sea en el pico de flauta o en todo el medio.
- Prueba negativa si el medio conserva su color original.( Figura 17-2) (BOQUET, et. al., 1995, p. 142)



**Figura 17-2:** Prueba Bioquímica en agar Urea  
Fuente: Izurieta, 2011

#### 2.6.15.3 Método de inoculación en Citrato

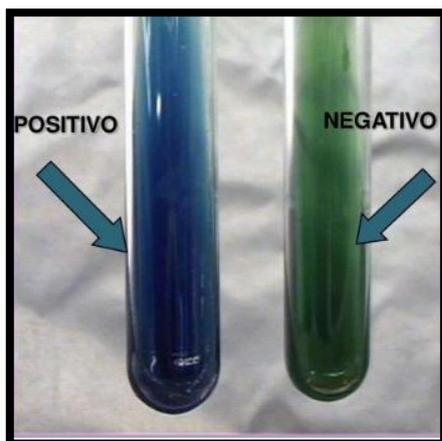
Indica la capacidad de los microorganismos de usar el citrato, como única fuente de carbono, produciendo alcalinidad. (BOQUET, et. al., 1995, p.116)

Procedimiento:

- En el interior de la cámara de flujo laminar y con la aguja del asa previamente esterilizada se tomó una pequeña cantidad de colonia y se estrió en zic-zac en el pico de flauta, empezando desde el fondo hasta la parte más alta.
- Se incubo a 35 °C durante 24 horas en aerobiosis.

La interpretación de los resultados:

- Se considera como prueba positiva la existencia de colonias en el estriado hecho en el pico de flauta.
- Prueba positiva si se observó cambio en la coloración del medio, de verde a azul. (Figura 18-2) (BOQUET, et. al., 1995, p. 116)



**Figura 18-2:** Prueba Bioquímica en Agar Citrato  
Fuente: Izurieta, 2011

#### 2.6.15.4 Medio SIM

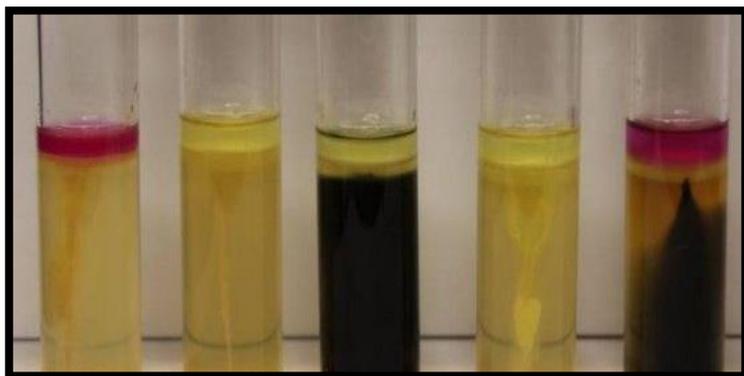
El medio SIM es semisólido y permite evidenciar la producción de Indol, movilidad y de sulfuro de hidrogeno de los microorganismos. (BOQUET, et. al., 1995, p. 127)

Procedimiento:

- En el interior de la cámara de flujo laminar y con la ayuda del aguja del asa esterilizada, se tomó una pequeña cantidad de muestra y se sembró en el medio mediante una punción un poco más de la mitad.
- Se incubo a una temperatura de 35°C por 24 horas.
- Completado el tiempo de incubación se añadió al medio 5 gotas del Reactivo de Kovacs, y se agitó suavemente.

Interpretación de los resultados:

- Si en la superficie del medio se forma un anillo de color rojo esto indica que existe la producción de Indol.
- Si en la superficie del medio no se forma el anillo de color rojo, la prueba será negativa.
- Si el microorganismo tiene movilidad, se observa un crecimiento sobrepasado de la línea de siembra y el medio cambiara a turbio.
- Si no existe movilidad, no sobrepasa la línea de siembra.
- Si se produce sulfuro de hidrogeno, el medio cambia a negro, caso contrario no habrá cambio alguno. Figura 19-2 (BOQUET, et. al., 1995, p. 127)



**Figura 19-2:** Prueba Bioquímica SIM (Indol, Movilidad, H<sub>2</sub>S)

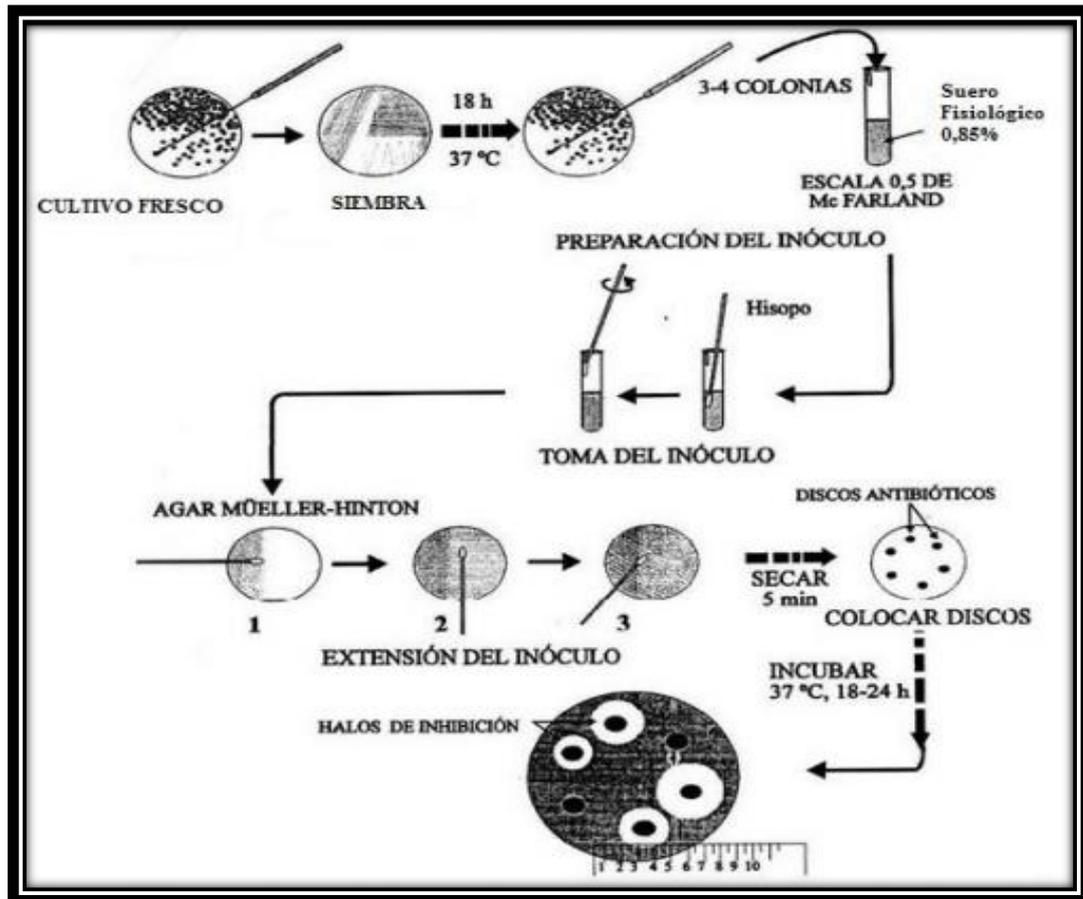
Fuente: Izurieta, 2011

#### ***2.6.16. Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana***

Esta prueba es también conocida como antibiograma se realizó mediante el método de disco-placa o de Kirby-Bauer. El método consiste en ubicar un disco de papel de filtro con una cantidad de un antimicrobiano, sobre la superficie de una placa de agar Mueller Hinton previamente inoculada con el microorganismo a evaluar; el antimicrobiano difunde al medio de agar formándose un gradiente de concentración que puede inhibir el crecimiento bacteriano.

Procedimiento:

- En el interior de la cámara de flujo laminar y con ayuda de un hisopo previamente esterilizado, se tomó una colonia y se suspendió en un tubo con suero fisiológico.
- Posteriormente se tomó el hisopo y se eliminó el exceso de suspensión en las paredes del tubo.
- Se estrió en el medio Mueller Hinton por toda la superficie, procurando que no quede espacios sin cubrir.
- Una vez sembrada en la placa se procedió a colocar los discos con ayuda de una pinza metálica previamente esterilizada.
- Hay que asegurarse de que los discos queden bien adheridos al medio y para esto se realizó una pequeña presión teniendo cuidado de no romper el medio de cultivo.
- El número de discos colocados fue de 7 ya que esto nos permite tener más comodidad en las lecturas de los halos que se formen y no se sobrepongan unos con otros.
- Se incubo por 24 horas a una temperatura de 37 °C, trascurrido el tiempo de incubación se procedió a medir los halos de inhibición con una regla. (Figura 20-2)



**Figura 20-2:** Método de difusión en Agar Mueller Hinton.

Fuente: [http://campus.usal.es/~micromed/Practicas\\_odontologia/idades/labv/LabMicro/Antibiograma.html](http://campus.usal.es/~micromed/Practicas_odontologia/idades/labv/LabMicro/Antibiograma.html)

Los Antibióticos que se usaron para bacterias Gram positivas y Gram negativas

### Gram Positivos

- Oxacilina (OX)
- Kanamicina (K)
- Amoxicilina /ácido clavulanico (AMC)
- Cefalotina (KF)
- Ceftriaxona (CRO)
- Eritromicina (E)
- Ciprofloxacina (CIP)
- Penicilina (P)
- Vancomicina (VA)
- Tetraciclina (TE)
- Imipenem (IMP)
- Ampicilina (AM)
- Nitrofurantoina (F)
- Gentamicina (CN)

### **Gram Negativos**

- Carbenicilina (PY)
- Trimetoprima/sulfametoxazol (SXT)
- Amoxicilina /ácido clavulanico (AMC)
- Cefalotina (KF)
- Ceftriaxona (CRO)
- Kanamicina (K)
- Ciprofloxacina (CIP)
- Estreptomicina (S)
- Tetraciclina (TE)
- Imipenem (IMP)
- Ampicilina (AM)
- Nitrofurantoina (F)
- Gentamicina (CN)

## CAPÍTULO III

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

Los valores que se presentan en las siguientes tablas, corresponden a los resultados obtenidos en todas las pruebas realizadas en las aguas termales del Balneario Cununyacu de la Provincia de Pichincha, donde se recolecto las muestras de los cinco sitios escogidos (A, B, C, D y E).

#### 3.1. Resultado de la medición de los Parámetros In Situ

**Tabla 1-3:** Resultados de la determinación de los parámetros in-situ de las aguas termales del Balneario “Cununyacu” (Primer muestreo)

PARÁMETROS IN SITU MUESTREO 1						
SITIO						
MUESTRAS	A	B	C	D	E	PROMEDIO
Temperatura Ambiente (°C)	18	18	18	18	18	18
Temperatura Muestras(°C)	27	27,5	29	28	28	27,9
pH	7	7	7	7	7	7

Realizado por: GUALLPA, S., 2016

**Tabla 2-3:** Resultados de la determinación de los parámetros in-situ de las aguas termales del Balneario “Cununyacu” (Segundo muestreo)

PARÁMETROS IN SITU MUESTREO 2						
SITIO						
MUESTRAS	A	B	C	D	E	PROMEDIO
Temperatura Ambiente (°C)	22	22	22	22	22	22
Temperatura Muestras(°C)	27	28	29	28	28	28
pH	7	7	7	7	7	7

Realizado por: GUALLPA, S., 2016

En las siguientes tablas se muestran los valores obtenidos de los parámetros *in situ* que fueron tomados de los sitios escogidos del balneario, presentando en el primer muestreo (Tabla 1-3) una temperatura ambiental promedio de 18 °C y una temperatura promedio del agua de 27,9 °C. En el segundo muestreo (Tabla 2-3) el valor promedio de la temperatura ambiental fue de 22°C y el valor promedio de la temperatura del agua fue de 28°C lo que demuestra que la temperatura promedio del balneario fue de 9,9 °C en el primer muestreo y de 6 °C en el segundo. La diferencia entre la temperatura del agua y la temperatura ambiental en los dos casos están sobre 5°C por lo cual es considerada como agua termal.

La variación que existe en la temperatura ambiente del primer y segundo muestreo se puede justificar por la hora que fue tomada la temperatura, ya que se efectuaron en diferente horario. La toma de la muestra en el primer muestreo se realizó por la mañana, mientras que el segundo muestreo se realizó por la tarde. .

Según (Armijo et al., 1994) y el INAMHI consideran a las aguas hipotermas a aquellas que tienen una temperatura entre 20 y 35 °C, es así que la temperatura promedio del balneario en estudio es de 27,9 °C en el primer muestreo y 28 °C en el segundo muestreo lo que hace que a las aguas del Balneario “Cununyacu” se las denominen como hipotermas.

El estudio físico-químico realizado en el Balneario por el INAMHI en el año 2013 reportó que su temperatura fue de 26,8 °C lo cual indica que la diferencia es mínima con la temperatura reportada en este trabajo. El valor de pH que se obtuvo en el estudio realizado fue de 7 el cual indica que las aguas son neutras, valor que concuerda con el estudio del INAMHI (2013) que reportó un valor de 7,18, existiendo una mínima variación.

En el estudio físico-químico realizado en las aguas mineromedicinales del Balneario de Alicún de las Torres en el 2009, se obtuvieron valores de pH ligeramente superiores a 7, similares a los valores obtenidos en nuestro estudio. (DE LA ROSA et al., 2009, p. 47)

El pH ácido o básico que presentan los balnearios depende de la composición química que tengan, este parámetro es fundamental en el crecimiento microbiano ya que cada microorganismo posee un intervalo definido de pH y la mayoría crece en un pH comprendido entre 5 y 8.

### 3.2. Recuento de bacterias Aerobias Mesófilas

El conteo de las bacterias aerobias mesófilas se realizó mediante el método de Petrifilm, en el mismo fueron sembradas las muestras de los sitios seleccionados en el muestreo y tras una incubación a 35°C por 48 horas, en el crecimiento se obtuvieron los siguientes resultados. (Tabla 3-3)

**Tabla 3-3:** Resultado del recuento de bacterias Aerobias Mesófilas (UFC/mL) de las aguas termales del Balneario “Cununyacu”.

Sitio de Muestreo	Muestra	Número de UFC/mL	Media ( $\bar{X}$ ) UFC/mL	Varianza	Desviación Estándar (Ds)
A	1	$6,1 \times 10^1$	$1,40 \times 10^2$	3326898,99	1823,979
	2	$2,19 \times 10^2$			
B	1	$5,2 \times 10^1$	$3,07 \times 10^2$		
	2	$5,62 \times 10^2$			
C	1	$1,26 \times 10^2$	$1,251 \times 10^3$		
	2	$2,376 \times 10^3$			
D	1	$4,64 \times 10^2$	$2,620 \times 10^3$		
	2	$4,775 \times 10^3$			
E	1	$6,52 \times 10^2$	$2,513 \times 10^3$		
	2	$4,374 \times 10^3$			
<b>PROMEDIO BALNEARIO</b>			<b><math>1,366 \times 10^3</math></b>		

Realizado por: GUALLPA, S., 2016

En nuestro estudio, el número de bacterias Aerobias Mesófilas encontradas en los lugares donde se tomó las muestras, indica que el mayor crecimiento bacteriano se dio en el sitio D con una cantidad de  $2,62 \times 10^3$  UFC/mL, representando un 38% del total de bacterias presentes en el balneario, seguida muy cerca del sitio E con un valor de  $2,513 \times 10^3$  UFC/mL y representando el 37 % del total de las bacterias aerobias mesófilas. El sitio C tuvo un valor de crecimiento de  $1,251 \times 10^3$  UFC/mL representando el 18% del valor total de las bacterias, los sitios A y B fueron los lugares en donde hubo menor crecimiento bacteriano con un  $1,40 \times 10^2$  UFC/mL representando el 2% y  $3,07 \times 10^2$  representando el 5% las bacterias aerobias mesófilas del balneario respectivamente.

Desde los finales del siglo XX el número de aerobios mesófilos ha sido usado como un indicador de calidad de bebidas y de aguas subterráneas, un valor por debajo de 100 UFC /mL indica una buena protección del acuífero y no representan un riesgo sanitario. (Vademécum de Aguas Mineromedicinales Españolas, 2000)

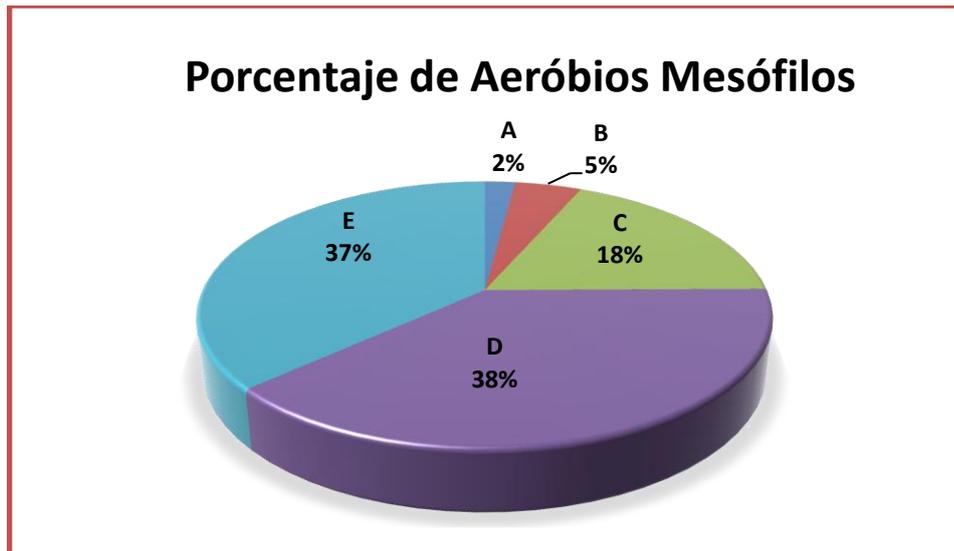
(De La Rosa y Mosso, 2000, pp.153-154) Indica que en las aguas termales existe dos grupos de microorganismos, los mismos son las bacterias autóctonas que dependen de las propiedades físicas y químicas del agua, pH, temperatura, nutrientes y oxigenación, el segundo grupo pertenece a las bacterias alóctonas las cuales proceden del vegetales, suelo, aguas residuales, heces fecales, el número de bacterias presentes varia en relación al tipo de agua, sustancias orgánicas, cantidad de sales inorgánicas, temperatura y enturbiamiento.

Andueza 2014; Señala que la presencia de un número elevado de bacterias aerobias mesofilas es indicativa de contaminación y problemas de higiene del agua. El Código Sanitario Mexicano establece que la cuenta de mesófilos aerobios no debe exceder de 200 colonias/mL de agua, lo cual no coincide con el conteo realizado en el presente estudio, ya que la mayoría de sitios muestreados sobrepasan de los valores establecidos. (Técnicas para la enumeración de microorganismos, 2012)

Las normas sanitarias de calidad del agua potable, de Venezuela (1998) manifiesta que no debe existir la presencia de microorganismo aerobios mesófilos en una densidad mayor a 100 UFC/mL, lo cual no concuerda con nuestro estudio.

Los datos obtenidos en el presente estudio (Tabla 3-3) no coinciden con los reportados por De la Rosa, en el 2004, quien manifiesta que las aguas subterráneas contienen baja cantidad de microorganismos consecuencia del escaso o nulo aporte energético y a la escasez de nutrientes además de que el hombre es causante de alterar el habitat y de introducir sustancias extrañas que provoca una alteración y proliferación de microorganismos.

De la Rosa et al., 2001 realizaron un estudio microbiológico de las aguas mineromedicinales del Balneario “El Paraíso” de Manzanera el cual tiene una temperatura de emergencia de 14°C y un pH neutro. Los resultados obtenidos en ese balneario son inferiores a 100 UFC/mL, bacterias viables y esporuladas son inferiores a 30 UFC/mL, indicando que en el balneario existe buena calidad del agua desde el punto de emergencia hasta las piscinas, lo contrario de los resultados obtenidos en el presente estudio.



**Grafico 1-3:** Porcentaje del recuento de Aerobios Mesófilos (UFC/mL) de las Aguas Termales del Balneario “Cununyacu”  
 Realizado por: GUALLPA, S., 2016

De la Rosa et al., 2002 realizaron un estudio de la microbiología del agua mineromedicinal de los Balnearios de Alhama de Granada, el cual revelo un número de bacterias heterótrofas, aerobias y esporuladas inferior a 100 UFC /mL, valores muy por debajo de los obtenidos en nuestro estudio (Tabla 3-3), la diferencia indica que no existe una protección adecuada en el lugar de donde emerge el agua, probablemente debido a que se encuentra en contacto directo con el exterior.

La cantidad total de bacterias aerobias mesófilas encontradas en el balneario Cununyacu fue de  $1,366 \times 10^3$  lo cual difiere con los resultados obtenidos por Mosso et al., (2006) (2008) en los balnearios Cervantes y Valdelateja en Burgos, reportaron que la cantidad de bacterias heterótrofas y oligotróficas presentes fueron menores a 100 UFC/mL, indicando que la normativa en España es muy buena y que todos los balnearios cumplen con las normas, garantizando la seguridad de los usuarios que visitan el lugar. En todos los estudios que se han mencionado, los valores de aerobios mesófilos son inferiores a 100 UFC/mL lo cual muestra un buen mantenimiento y protección de los manantiales.

Según el boletín oficial de Canarias N° 38, de 1989 orden que regula el régimen técnico sanitario de piscinas, indica que la cantidad de bacterias aerobias totales permisibles debe ser menor a 200 UFC/mL, en este caso el balneario Cununyacu no se encuentra dentro de los límites permitidos.

### 3.3. Recuento de bacterias Coliformes fecales y totales

El conteo de las bacterias coliformes totales y fecales se realizó por el método de Petrifilm, en los mismos fueron sembradas las muestras de los sitios seleccionados obteniéndose los siguientes resultados.

**Tabla 4-3:** Resultado del recuento de *E. coli*/coliformes (UFC/mL) de las aguas termales del Balneario “Cununyacu”.

Sitio De Muestreo	Muestra	<i>Escherichia coli</i> UFC/mL	Coliformes UFC/mL	Media $\bar{x}$ (CF) Ufc/ml	Media $\bar{x}$ (CT) Ufc/ml
A	1	9,0	3,02x10 <sup>2</sup>	7,0	1,79x10 <sup>2</sup>
	2	5,0	5,6x10 <sup>1</sup>		
B	1	9,0	4,39x10 <sup>2</sup>	6,0	3,578x10 <sup>2</sup>
	2	3,0	2,765x10 <sup>2</sup>		
C	1	3,8x10 <sup>1</sup>	8,71x10 <sup>2</sup>	6,6x10 <sup>1</sup>	5,32x10 <sup>2</sup>
	2	9,4x10 <sup>1</sup>	1,93x10 <sup>2</sup>		
D	1	9,0	6,09x10 <sup>2</sup>	3,2x10 <sup>1</sup>	1,998x10 <sup>3</sup>
	2	5,5x10 <sup>1</sup>	3,3865x10 <sup>3</sup>		
E	1	1,0x10 <sup>1</sup>	8,79x10 <sup>2</sup>	2,65x10 <sup>1</sup>	6,345 x10 <sup>2</sup>
	2	4,3x10 <sup>1</sup>	3,90x10 <sup>2</sup>		
<b>PROMEDIO BALNEARIO</b>				<b>5,5x10<sup>1</sup></b>	<b>7,402 x10<sup>2</sup></b>

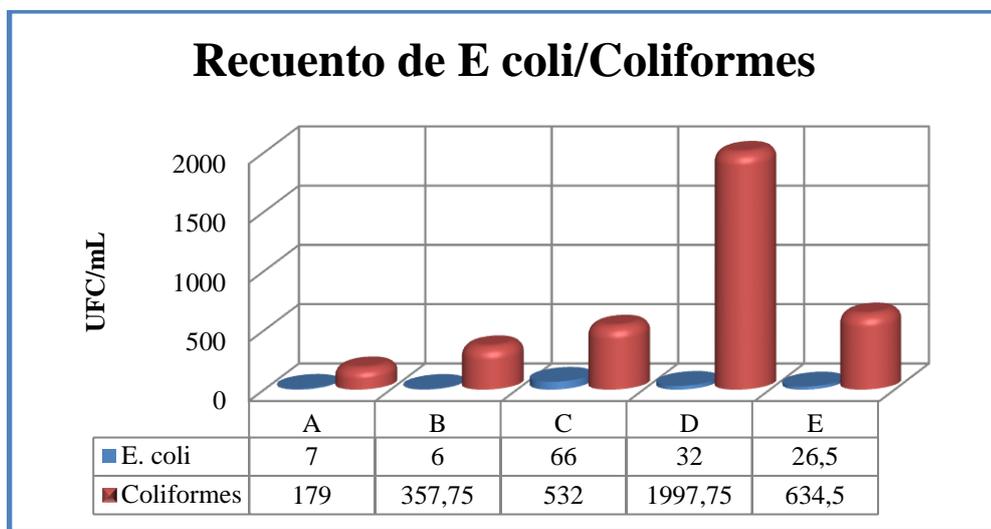
Realizado por: GUALLEPA, S., 2016

En la Tabla 4-3 se muestran los resultados del conteo de bacterias coliformes totales y fecales de las muestras sembradas, pudiéndose observar que en todas las muestras existe la presencia de coliformes fecales, sobretodo en el sitio D con un valor promedio de 6,6 x10<sup>1</sup>UFC/mL, en cambio en los sitios A y B aunque la presencia de coliformes fecales es menor, igual es significativo.

Todas las muestras presentan un alto número de coliformes totales, cabe recalcar que lo coliformes totales no son indicativo de contaminación, ya que incluyen bacterias Gram negativas fermentativas conformadas por *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, cuya presencia puede ser fecal o pueden proceder del suelo y sobrevivir en el agua ya que tienen gran facilidad de adaptación a los ambientes acuáticos. Para determinar si la contaminación es de origen fecal tomaremos como indicador la presencia de *E coli*.

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

El Real Decreto 742/2013, de 27 de septiembre, por el que se establecen los criterios técnico-sanitarios de las piscinas, indica que la presencia de *Escherichia coli* es de 0 UFC/100mL de agua, y en el caso de sospecha o incumplimiento del valor establecido se tomara las medidas correspondientes para que no exista peligro en la salud de los bañistas. (BOLETIN OFICIAL DE ESTADO, 2013, p. 11)



**Grafico 2-3:** Recuento de *Escherichia coli*/ coliformes (UFC/mL) de las Aguas Termales del Balneario Cununyacu.

Realizado por: GUALLPA, S., 2016

La Norma Oficial Mexicana Nom-127-Ssa1-1994, "Salud Ambiental, Agua Para Uso y Consumo Humano indica que el número permisible de coliformes totales es de 2 UFC/100 ml y el valor permisible de organismos coliformes fecales es de cero UFC/100 ml, indicando que los valores obtenidos en nuestro estudio no concuerda con la norma estipulada.

Mora, Darner., en 1996 analizó la calidad de las aguas dulces utilizadas para recreación y estableció que la cantidad de *E. coli* en este tipo de aguas debe ser menor a 2UFC/mL, los resultados obtenidos en el balneario Cununyacu indico que se encontró un valor promedio de  $5,5^1 \times 10$  UFC/mL lo que indica que este número está muy por encima de lo permisible en este tipo de aguas.

Los análisis realizados en las aguas minero medicinales del Balneario de Alhama de Granada y en el Balneario Alicum de las Torres por De la Rosa et, al., (2002) (2009), indicaron que no se encontraron indicadores fecales (*Escherichia coli*, *enterococos* y *Clostridium perfringens*) en 100 mL de agua. Mosso et al., 2006 analizaron las aguas del manantial de la fuente San Camilo, indicando que no se encontraron indicadores fecales en 100mL de agua, pero si hubo la presencia de coliformes totales en un número muy bajo menos de 10 UFC/100mL de agua, observándose que los resultados difieren con los obtenidos en nuestro estudio.

De la Rosa et al., en el 2011 realizaron un estudio en los manantiales mineromedicinales del Balneario la Concepción de Villatoya, en el cual los resultados arrojaron que en ninguno de los tres manantiales estudiados existe la presencia de microorganismos indicadores de contaminación fecal en 100 mL de agua, asegurando así que las aguas del manantial no representan ningún riesgo para la salud de los usuarios, estos datos difieren de los obtenidos en el presente estudio ya que en todas las muestras existe la presencia de *E. coli*.

Vendrell, M. C., et al, en 1998 en las inmediaciones de la fuente termal de Tinteiro fueron encontrados la presencia de patógenos fecales por lo que no fue considerada como agua potable ya que aparecen al menos uno de los microorganismos prohibidos por la legislación para ser considerada agua en buen estado microbiológico. En el balneario Cununyacu también existió la presencia de estos microorganismo, los mismos pudieron proceder de los alrededores de las zonas de recolección ya que al existir un gran número de vertientes, el agua contaminada puede infiltrarse hasta mezclarse con el agua de la fuente, no hay que descartar que la presencia de estos microorganismo en las piscinas pudieron ser aportados por los bañistas, ya que esos géneros se adaptan a las condiciones del ambiente.

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

La determinación del número de *Staphylococcus* se realizó mediante el método de Petrifilm, usando la placa Staph express sembrando 1mL de las muestras luego de 48 horas, con una incubación a 35°C.

**Tabla 5-3:** Resultado del recuento de bacterias *Staphylococcus aureus* (UFC/mL) de las aguas termales del Balneario “Cununyacu”.

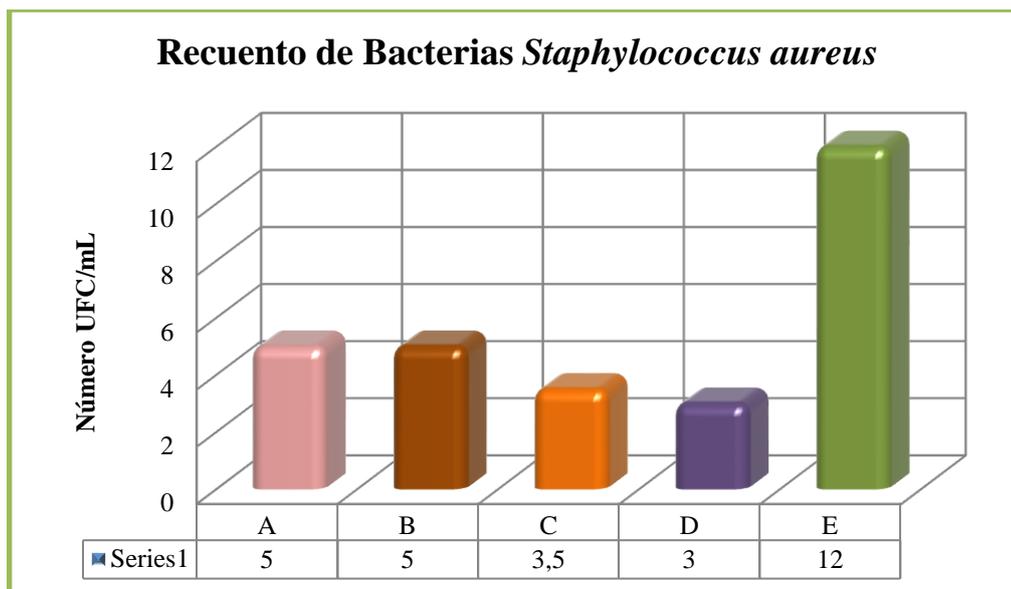
Sitio De muestreo	Muestra	Colonia rojo-violeta UFC/mL	Media ( $\bar{X}$ ) UFC/mL	Varianza	Desviación estándar (Ds)
A	1	8,0 x10 <sup>0</sup>	5,0 x10 <sup>0</sup>	12,489	3,534
	2	2x10 <sup>0</sup>			
B	1	8,0x10 <sup>0</sup>	5,0x10 <sup>0</sup>		
	2	2 x10 <sup>0</sup>			
C	1	5,0x10 <sup>0</sup>	3,5x10 <sup>0</sup>		
	2	2x10 <sup>0</sup>			
D	1	3,0x10 <sup>0</sup>	3,0x10 <sup>0</sup>		
	2	3,0x10 <sup>0</sup>			
E	1	1,0x10 <sup>1</sup>	1,2x10 <sup>1</sup>		
	2	1,4x10 <sup>1</sup>			
<b>PROMEDIO BALNEARIO</b>			<b>5,7x10<sup>0</sup></b>		

Realizado por: GUALLPA, S., 2016

Según lo reportado en la tabla 5-3 el recuento de *Staphylococcus aureus* en los sitios A y B tuvo un valor promedio de 5UFC/mL para ambos casos, en el sitio C el recuento fue de 3,5UFC/mL, en el sitio D la presencia de *Staphylococcus aureus* fue de 3UFC/mL y finalmente el sitio E con un valor promedio de 1,2x10<sup>1</sup> UFC/mL indicando que hay un mayor número del género en este sitio.

El *Staphylococcus aureus* forman parte de la flora normal de las personas encontrándose en las fosas nasales, la piel, axilas y vagina, sin embargo puede resultar peligrosas para personas inmunocomprometidas que tengan heridas, diabetes mellitus, artritis, enfermedades crónicas, ocasionando enfermedades de riesgo vital como neumonías, meningitis, osteomielitis, etc. (Bustos, 2006, p. 288)

De la Rosa. et al, en el 2007 y en el 2009 realizaron un estudio de la microbiota de los manantiales mineromedicinales del Balneario Puente Viesgo, y del Balneario El Paraíso de Manzanera, indicando que no existió la presencia de bacterias patógenas (*Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa*) en 250 mL de agua estudiada, resultados que fueron contrarios a nuestra investigación (Gráfico 3-3) ya que en este caso se encontró la presencia de *Staphylococcus aureus* en baja cantidad.



**Gráfico 3-3:** Recuento de bacterias *Staphylococcus aureus* (UFC/mL) de las aguas termales del Balneario “Cununyacu”.

Realizado por: GUALLPA, S., 2016

Mosso et al., (2006) (2011) realizaron un estudio microbiológico de los manantiales mineromedicinales del Balneario Cervantes y del Balneario Baños de la Concepción reportando que tanto en los puntos de emergencia de los manantiales como en los baños de la fuente no se encontraron bacterias patógenas (*Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila*) en 250 mL de agua.

Mora Derner funcionario del Laboraorio Nacional de Aguas de Costa Rica en 1996 estableció que la cantidad de bacterias *Staphylococcus aureus* para aguas de recreación (natación) debe ser meno a 100UFC/100mL, al contrastar con nuestro estudio podemos observar que los valores obtenidos sobrepasan el limite permisible, indicando que existe contaminación, la misma que puede provenir del aire de la vegetación presente en el lugar de donde emerge el agua, de los animales que habitan en el área o de los propios bañistas que visitan el balneario.

### 3.5. Recuento de Mohos y Levaduras

El conteo de mohos y levaduras se realizó mediante el método de Petrifilm, en el mismo fueron sembradas las muestras de los sitios seleccionados en el muestreo, obteniendo los siguientes resultados. (Tabla 6 -3)

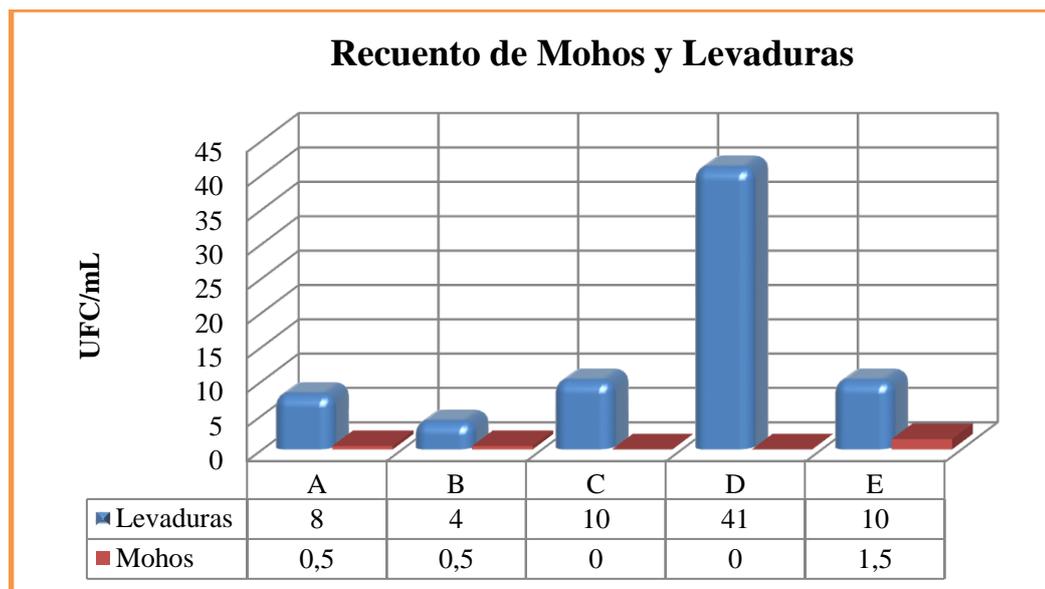
**Tabla 6-3:** Resultado del recuento de Mohos y Levaduras (UFC/mL) de las aguas termales del Balneario “Cununyacu”.

Sitio de muestreo	Muestra	Número de Levaduras UFC/mL	Número de Mohos UFC/mL	Media $\bar{x}$ Levaduras UFC/mL	Media $\bar{x}$ Mohos UFC/mL
A	1	2,0	1,0	8,0	0,5
	2	6,0	0,0		
B	1	1,0	1,0	4,0	0,5
	2	3,0	0,0		
C	1	0,0	0,0	1,0x10 <sup>1</sup>	0,0
	2	2,0x10 <sup>1</sup>	0,0		
D	1	0,0	0,0	4,1x10 <sup>1</sup>	0,0
	2	8,2 x10 <sup>1</sup>	0,0		
E	1	4,0	3,0	1,0x10 <sup>1</sup>	1,5
	2	6,0	0,0		
<b>PROMEDIO BALNEARIO</b>				<b>1,24x10<sup>1</sup></b>	<b>0,5</b>

Realizado por: GUALLPA, S., 2016

En la Tabla 6-3 se indica el conteo de mohos y levaduras, mostrándose que existió un mínimo crecimiento de mohos en los sitios muestreado A y B, con un crecimiento promedio de 8,0 y 4,0 respectivamente, en el caso de las levaduras se puede apreciar que el valor promedio más alto de crecimiento fue en el sitio D (4,1x10<sup>1</sup> UFC/mL) seguido de los sitios C y E con un valor promedio de 1.0x10<sup>1</sup> UFC/mL cada uno.

En un estudio realizado por Andueza en el 2014 señala que un elevado número de hongos y levaduras es indicativo de problemas de higiene y contaminación ambiental, en la Norma Técnica Colombiana 813 (2007) de agua potable, señala que el número permisible de hongos y levaduras no debe ser mayor a 1 UFC/5 mL o 20 UFC/100mL. Indicando que los resultados no concuerdan con los obtenidos en nuestro estudio.



**Grafico 4-3:** Recuento de Mohos y Levaduras (UFC/mL) de las aguas termales del Balneario “Cununyacu”.

Realizado por: GUALLPA, S., 2016

De la Rosa et al., 2013 indica que los hongos encontrados en poca cantidad en las aguas mineromedicinales provienen del suelo y se adaptan a las condiciones de estos hábitat acuáticos con facilidad, y al estar en contacto con la piel puede producir infecciones.

Mosso et al. (2006) en estudios realizados en los manantiales mineromedicinales del Balneario Cervantes aislaron una cantidad inferior a 20/100mL de hongos filamentosos de los géneros *Penicillium*, *Acremonium*, *Mucor* y *Aureobasidium* indicando que los hongos en las aguas subterráneas se encuentran en poca cantidad y no se detectan, pero se los ha podido detectar en manantiales hipotermales y aguas subterráneas de uso público.

De la Rosa, et al, en el 2004 realizaron un estudio microbiológico de las aguas mineromedicinales del Balneario de Jaraba, dando como resultado el aislamiento de hongos filamentosos en un número muy pequeño inferior a 100UFC/100 mL, en el cual predominó el género *Penicillium* y únicamente se encontró dos cepas de levaduras; (Mosso et al., 2006) realizaron un estudio en el manantial mineromedicinal del Balneario Cervantes, en el cual se aislaron hongos filamentosos (>20/100mL) de los géneros *Penicillium*, *Acremonium*, *Mucor* y *Aureobasidium*.

De la Rosa et al., 2009 realizaron el estudio de los microorganismos presentes en los manantiales mineromedicinales del Balneario de Alicún de las Torres los resultados que se

obtuvieron indican la presencia de hongos filamentosos en un número de 600 UFC/100mL y los géneros encontrados fueron *Penicillium*, *Fusarium* y *Alternaria*; Mosso et al., 2002, realizaron un estudio de los manantiales del Balneario Alhama en la Provincia de Granada el cual se investigaron microorganismos de interés ecológico como mohos y levaduras determinando que en los manantiales existe un número bajo de crecimiento, menos de  $10^2$  en 100mL. Los mohos aislados e identificados corresponden a *Mucor*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Syncephalastrum* y *Ulocladium*. Las levaduras identificadas corresponden a *Candida lusitana*, *C. guilliermondii* y *Rhodotorula rubra*.

De La Rosa Ma. Carmen y Angeles Mosso (2000, p.157) señala que en las aguas termales existe baja cantidad de hongos, principalmente mohos de los géneros: *Penicillium*, *Aspergillus* y *Alternaria*. Estos géneros se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y al encontrarse en cantidades bajas no afectan a la calidad sanitaria de las aguas lo cual nos indica que no constituyen un riesgo sanitario para las personas.

En el caso de las levaduras los resultados encontrados en nuestro estudio (grafico 4-3) coinciden con los De la Rosa, et al., 2004 quienes también encontraron la presencia de levaduras en el Balneario Jaraba, al igual que el estudio realizado por Mosso et al, 2002, en el balneario Alhama. La presencia de un elevado número de levaduras en la piscina, se supone que provienen de ambientes externos como de las aguas de infiltración, o bien la mayoría de estos microorganismos pueden ser parte de la microbiota autóctona ya que pueden adaptarse a las condiciones de este tipo de hábitats debido a que son muy ubicuos.

### 3.6. Recuento de colonias en Agar Manitol Salado

**Tabla 7-3:** Resultado del recuento de colonias en la Placa Petri Manitol Salado (UFC/mL) de las aguas termales del Balneario “Cununyacu”.

Sitio de Muestreo	Muestra	Numero de Colonias 20µL UFC/ mL	Media ( $\bar{X}$ ) UFC/ mL	Numero de Colonias 100 µL UFC/ mL	Media ( $\bar{X}$ ) UFC/mL
A	1	0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0		0,0	
B	1	0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0		0,0	
C	1	0,0	0,0	2,0x10 <sup>1</sup>	1,0x10 <sup>1</sup>
	2	0,0		0,0	
D	1	0,0	2,5x10 <sup>1</sup>	0,0	2,05x10 <sup>2</sup>
	2	5,0x10 <sup>1</sup>		4,10x10 <sup>2</sup>	
E	1	0,0	2,5x10 <sup>1</sup>	0,0	8,5x10 <sup>1</sup>
	2	5,0x10 <sup>1</sup>		1,70x10 <sup>2</sup>	
<b>PROMEDIO</b>			<b>1,0x10<sup>1</sup></b>	<b>6,0x10<sup>1</sup></b>	

Realizado por: GUALLPA, S., 2016

### 3.7. Recuento de colonias en Agar Eosina Azul de Metileno

**Tabla 8-3:** Resultado del recuento de colonias en la Placa Petri Eosina Azul de Metileno (UFC/mL) de las aguas termales del Balneario “Cununyacu”.

Sitio de Muestreo	Muestra	Numero de Colonias UFC/mL (20µL)	MEDIA ( $\bar{X}$ ) 20 µL UFC/mL	Numero de Colonias UFC/mL (100µL)	MEDIA ( $\bar{X}$ ) 100 µL UFC/mL
A	1	0,0	0,0	8,40x10 <sup>2</sup>	5,30x10 <sup>2</sup>
	2	0,0		2,20x10 <sup>2</sup>	
B	1	0,0	0,0	2,310x10 <sup>3</sup>	2,125x10 <sup>3</sup>
	2	0,0		1,940x10 <sup>3</sup>	
C	1	1,1x10 <sup>3</sup>	2,050x10 <sup>3</sup>	1,110x10 <sup>3</sup>	4,775x10 <sup>3</sup>
	2	3,0x10 <sup>3</sup>		8,440x10 <sup>3</sup>	
D	1	2,30x10 <sup>3</sup>	4,625x10 <sup>3</sup>	9,230x10 <sup>3</sup>	1,4640x10 <sup>4</sup>
	2	6,950x10 <sup>3</sup>		2,0050x10 <sup>4</sup>	
E	1	2,850x10 <sup>3</sup>	2,725x10 <sup>3</sup>	2,8800x10 <sup>4</sup>	1,9060 x10 <sup>4</sup>
	2	2,6 x10 <sup>3</sup>		9,320x10 <sup>3</sup>	
<b>PROMEDIO</b>			<b>1,880x10<sup>3</sup></b>	<b>PROMEDIO</b>	<b>8,226 x10<sup>3</sup></b>

Realizado por: GUALLPA, S., 2016

En las tablas 7-3 y 8-3 se pudo observar la cantidad de colonias que crecieron en los agares Manitol Sanado y Eosina Azul de Metileno, indicando que existe mayor crecimiento en el agar Eosina Azul de Metileno que en el de Manitol. Las colonias que crecieron en el agar Eosina azul de metileno pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* y las mismas que pudieron provenir de la vegetación, del suelo, de la piel o de la flora intestinal de los bañistas o de los animales que habitan en la zona.

Las colonias que crecieron en el agar manitol salado generalmente pertenecen al género *Staphylococcus* las cuales pudieron provenir de la flora normal de la piel y mucosas, del aparato genitourinario, de las fosas nasales, región perineal, y nasofaríngea de los bañistas que visitan el balneario.

Las colonias escogidas para el aislamiento e identificación fueron las colonias que fermentaron lactosa las mismas presentaban un color rosado con un centro oscuro azulado, además hubo la presencia de colonias con un característico brillo metálico indicativo de *Escherichia coli*, las colonias que no fermentaron lactosa fueron incoloras las mismas no fueron empleadas. En el caso de las colonias crecidas en manitol, únicamente tomamos en cuenta las colonias que fermentaban manitol, las mismas presentaron una coloración amarilla, con halo del mismo color típicas de las colonias coagulasa positiva (*Staphylococcus aureus*).

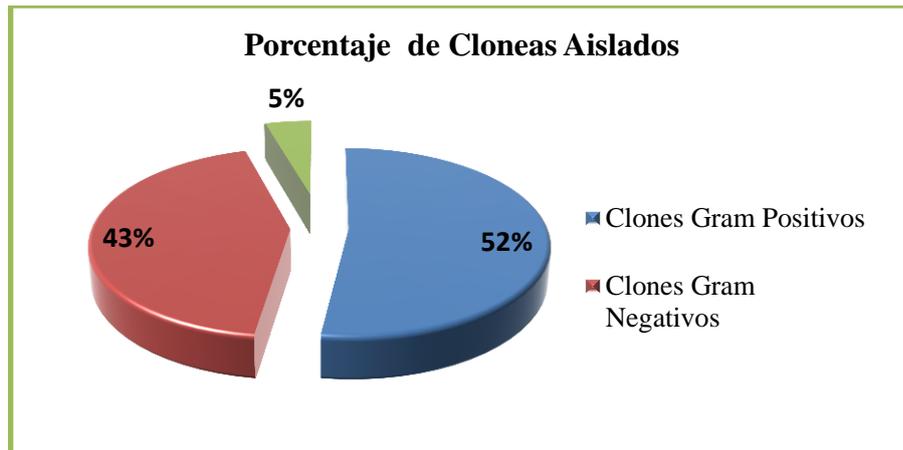
### 3.8. Número de clones aislados del Balneario “Cununyacu”

**Tabla 9-3:** Número de clones aislados del Balneario “Cununyacu”

SITIO	CLONES GRAM (+)	CLONES GRAM (-)	CLONES CONTAMINADOS
A	14	11	3
B	19	17	2
C	21	13	1
D	17	15	1
E	23	22	1
<b>TOTAL</b>	<b>94 (52%)</b>	<b>78 (43%)</b>	<b>8 (5%)</b>

Realizado por: GUALLPA, S., 2016

En el presente trabajo se logró aislar un total de 180 clones (Tabla 9-3), de los cuales 94 (52%) resultaron ser Gram positivos, 78 (43%) Gram negativos y 8 (5%) clones que no pudieron ser separados, las bacterias que predominaron fueron los cocos Gram positivos.



**Grafico 5-3:** Porcentaje de Bacilos y cocos Gram negativos, bacilos y cocos Gram positivos aislados del Balneario Cununyacu.

Realizado por: GUALLPA, S., 2016

Según Ma, Carmen De La Rosa y Angeles Mosso (2001, p.153) en un estudio realizado en las aguas hipotermas indicaron que existe el predominio de bacterias Gram positivas en cambio en las aguas mesotermas predominan los bacilos Gram negativos y los cocos Gram positivos. La elevada temperatura de las aguas hipotermas puede ser la causa de esta diferencia ya que las bacterias Gram positivas son más resistentes al calor, esto coincide con los resultados encontrados en el presente estudio.

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* ya que soportan elevadas concentraciones de sal, lo reportado en este estudio concuerda con los de nuestro balneario ya que existió el predominio de cocos positivos en especial del género *Staphylococcus* y del género *Micrococcus*. Entre otros géneros que se han identificado en las aguas minerales termales se encuentran las *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Acinetobacter* y *Arthrobacter*

Mosso et al., en el 2004 ya que en el estudio realizado en la microbiota del agua mineromedicinal del Balneario Jaraba se aislaron 254 cepas de las cuales (96,1%) fueron identificadas, correspondiendo (65%) a bacilos Gram negativos, (17,3%) a cocos Gram positivos y (13,8%). bacilos Gram positivos (Mosso. et al., 2004)

Mosso & De la Rosa en el año 2011 realizaron un estudio de las aguas mineromedicinales del Balneario la Concepción de Villatoya en el cual se realizó la identificación de las bacterias Heterótrofas, en el mismo fueron aisladas 135 cepas de bacterias, que corresponden el 60% a

bacilos Gram negativos, el 29,6% bacilos Gram positivos, y el 10,4% a cocos Gram positivos, perteneciendo la gran mayoría de cepas identificadas a *Phylum Proteobacteria* (60%), y en menor proporción a los *Phyla*; *Actinobacteria* (25,9%), y *Firmicutes* (14,1%).

Estudios realizados por De la Rosa et al., en el año 2009 de la microbiota de las aguas mineromedicinales del Balneario Alicún de las Torres, reportaron que en los dos manantiales se aislaron 60 cepas de bacterias heterótrofas y oligotrofas, en las mismas fueron identificadas 55 cepas un 91,6%, las cuales correspondieron a los tipos morfológicos de bacilos Gram negativos en un 54,5%, bacilos Gram positivos (29,1%) y cocos Gram positivos (16,4%); De la Rosa, Ma, Carmen., et al., en el año 2013 efectuaron un estudio microbiológico de las aguas mineromedicinales del Balneario Raposo en el cual se reportaron el aislamiento de 115 cepas de bacterias heterótrofas y oligotrofas correspondiendo el 73% a bacilos Gram negativos, 23,5% a bacilos Gram positivos y el 3,5% a cocos Gram positivos. Los resultados obtenidos los balnearios no concuerdan con los obtenidos en nuestro estudio (Grafico 6 -3) ya que las bacterias que se encuentran en mayor cantidad son los cocos Gram positivos.

De la Rosa et al., en el 2002 realizaron un estudio de la microbiota del agua mineromedicinal del Balneario de Alhama de Granada en el cual se identificaron 53 cepas de bacterias heterótrofas que corresponden a bacilos Gram positivos (49,1%), cocos Gram positivos (30,2%) y bacilos Gram negativos (20,7%). En los manantiales hipertermales predominan las bacterias Gram positivas a las Gram negativas debido a que tienen una mayor resistencia a la temperatura y concentración de sales Al comparar con los valores obtenidos en nuestro estudio, observamos que existe similitud ya que predominan los cocos Gram positivos a los bacilos Gram negativos.

### 3.9. Morfología macroscópica de las colonias bacterianas puras obtenidas en las aguas termales del balneario “Cununyacu”

**Tabla 10-3:** Características macroscópicas de las colonias puras obtenidas en las aguas termales del Balneario “Cununyacu”

<b>MORFOLOGIA MACROSCÓPICA (COCOS GRAM POSITIVOS)</b>							
<b>Clon</b>	<b>Forma</b>	<b>Borde</b>	<b>Elevación</b>	<b>Superficie</b>	<b>Color</b>	<b>Consistencia</b>	<b>Tamaño</b>
1-17	Circular	Entero	Conexa	Lisa	Hueso	Creмоса	5 mm
1-22	Circular	Ondulado	Convexa	Lisa	Mostaza	Creмоса	6 mm
1-32	Circular	Entero	Conexa	Lisa	Hueso	Creмоса	4 mm
1-33	Circular	Ondulado	Elevada	Rugosa	Hueso	Creмоса	8 mm
1-39	Circular	Entero	Acuminada	Rugosa	Crema	Creмоса	11 mm
1-41	Circular	Ondulado	Elevada	Lisa	Blanca	Creмоса	4 mm
2-1	Circular	Entero	Elevada	Rugosa	Mostaza	Creмоса	6 mm
2-2	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Blanca	Creмоса	4 mm
2-10	Circular	Ondulado	Convexa	Lisa	Amarilla	Creмоса	3 mm
2-12	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Blanca	Creмоса	4 mm
2-23	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Hueso	Creмоса	8 mm
2-67	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Mostaza	Creмоса	6 mm
3-14	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Mostaza	Creмоса	5 mm
3-19	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Marrón	Creмоса	5 mm
3-42	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Mostaza	Creмоса	9 mm
4-5	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Hueso	Creмоса	6 mm
4-24	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Mostaza	Creмоса	10 mm
<b>MORFOLOGIA MACROSCOPICA (BACILOS GRAM NEGATIVOS)</b>							
<b>Clon</b>	<b>Forma</b>	<b>Borde</b>	<b>Elevación</b>	<b>Superficie</b>	<b>Color</b>	<b>Consistencia</b>	<b>Tamaño</b>
1-20	Circular	Ondulado	Elevada	Rugosa	Mostaza	Membranosa	7 mm
1-24	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Crema	Creмоса	12 mm
1-44	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Hueso	Creмоса	5 mm
3-10	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Crema	Creмоса	10 mm
<b>MORFOLOGIA MACROSCOPICA BACILOS GRAM POSITIVAS</b>							
<b>Clon</b>	<b>Forma</b>	<b>Borde</b>	<b>Elevación</b>	<b>Superficie</b>	<b>Color</b>	<b>Consistencia</b>	<b>Tamaño</b>
3- 1	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Blanca	Creмоса	12 mm

Realizado por: Guallpa, 2016

De los 180 clones bacterianos aislados y luego de la realizar los repiques, se estabilizaron un total de 172 clones puros, de los cuales se escogieron 22 clones para su caracterización en base a su tamaño, color y forma.

En cuanto al tamaño 17 (77%) colonias resultaron poseer un tamaño mayor o igual a 5mm, y únicamente 5 (23%) resultaron ser menor o igual a 4mm de diámetro. En cuanto al color de las colonias 7 (32%) presentaron un color mostaza, 4 (18%) fueron blancas, 6 (27%) presentaron un color crema hueso, 3 (13%) resultaron ser de color crema, 1 (5%) color amarilla y 1 (5%) de color marrón. En cuanto a la forma el 100% de las colonias presentaron forma circular. En cuanto a la consistencia el 95% de las colonias presentaron una consistencia cremosa y 5% presentaron una consistencia membranosa.

**Tabla 11-3:** Numero de clones puros seleccionados para su caracterización e identificación.

SITIO	Clones Gram (+)		Clones Gram (-)
	Cocos	Bacilos	Bacilos
A	3	1	1
B	5		1
C	2		1
D	5		1
E	2		
<b>TOTAL</b>	<b>17</b>	<b>1</b>	<b>4</b>

Realizado por: GUALLPA, S., 2016

En la Tabla 11-3 se observa los 22 clones seleccionados para su caracterización e identificación de los cuales 17 clones (77%) presentan una morfología de cocos Gram positivos, 4 clones (18%) son bacilos Gram negativos y 1 clon (5%) corresponde a un bacilo Gram Positivo, los mismos se pudieron identificar mediante la observación al microscopio con ayuda del lente de 100X.

### 3. 10. Resultados de las pruebas bioquímicas de los clones aislados.

Tabla 12-3: Pruebas bioquímicas de clones aislados (cocos Gram positivos) de las aguas Termales del Balneario “Cununyacu”.

N° CLON		1-17	1-22	1-32	1-33	1-39	1-41	2-1	2-2	2-10	2-12
ORIGEN	<b>Petrifilm</b>	Aerobios Totales	Staph Express	Agar Manitol Salado	<i>E.coli/</i> coliformes	Aerobios Totales	Eosina Azul de Metileno	Aerobios Totales	Agar Manitol Salado	Agar Manitol Salado	Agar Manitol Salado
	<b>Punto de muestreo</b>	Ojo de agua	Reservorio de agua	Reservorio de agua	Reservorio de agua	Ojo de agua	Piscina grande	Ojo de agua	Piscina grande	Piscina grande	Piscina pequeña
	<b>Tinción Gram</b>	Coco (+)	Coco (+)	Coco (+)	Cocos (+)	Coco (+)	Coco (+)	Coco (+)	Coco (+)	Coco (+)	Coco (+)
PRUEBAS	<b>Coagulasa</b>	NG	NG	NG	NG	NG	NG	SG	NG	SC	NG
	<b>Catalasa</b>	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
	<b>Oxidasa</b>	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
	<b>Hugh Leifsonn</b>	F	F	F	F	I	I	F	I	I	I
	<b>Kligler</b>	K/A	K/A	K/A	K/A	K/K	K/K	K/A	K/K	K/K	K/K
	<b>Urea</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<b>Agar Manitol</b>	Sin crecimiento	C/Nf	Sin crecimiento	C/Nf	Sin crecimiento	C/Nf	C/f	C/Nf	C/Nf	C/f
	<b>Crecimiento en NaCl 6,5%</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<b>Hemolisis</b>	$\beta$	$\gamma$	$\gamma$	$\gamma$	$\alpha$	$\alpha$	B	$\gamma$	$\gamma$	B
	<b>Noboviocina</b>	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
<b>Optoquina</b>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<b>Bacitracina</b>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<b>GÉNERO Y ESPECIE</b>	<i>S. saprophytico</i>	<i>S. saprophytico</i>	<i>S. saprophytico</i>	<i>S. saprophytico</i>	<i>S. viridans</i>	<i>S. viridans</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. aureus</i>	

O:Oxidativo  
F: Fermentativo  
I:Inerte

K: alcalino  
A: Acido  
R: Resistente

NG: No coagula  
SG: Si coagula  
S: Sensible

+: Positivo  
-: Negativo

C/f: Crecimiento/fermentación  
C/Nf: Crecimiento/sin fermentación

(Continúa).....

N° DE CLON		2-23	2-67	3-14	3-19	3-42	4-5	4-24
ORIGEN	<b>Petrifilm</b>	<i>E.coli/ coliformes</i>	Aerobios Totales	Staph Express	Staph Express	Agar Manitol Salado	Eosina Azul de Metileno	Staph Express
	<b>Punto de muestreo</b>	B	D	B	E	D	C	C
	<b>Tinción Gram</b>	Coco (+)	Coco (+)	Coco (+)	Coco (+)	Coco (+)	Coco (+)	Coco (+)
PRUEBAS	<b>Coagulasa</b>	NG	NG	SG	SG	NG	NG	NG
	<b>Catalasa</b>	+	+	+	+	+	+	-
	<b>Oxidasa</b>	-	-	-	-	-	-	+
	<b>Hugh Leifsonn</b>	F	F	I	I	F	O	F
	<b>Kligler</b>	K/A	K/A	K/K	K/K	K/A	K/K	K/K
	<b>Urea</b>	+	+	+	+	+	+	+
	<b>Agar Manitol</b>	Sin crecimiento	Sin crecimiento	C/F	C/F	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento
	<b>Crecimiento en NaCl 6,5%</b>	-	-	-	-	-	-	-
	<b>Hemolisis</b>	$\gamma$	$\gamma$	$\beta$	$\beta$	$\gamma$	$\gamma$	$\alpha$
<b>Noboviocina</b>	R	R	R	R	R	R	R	
<b>Optoquina</b>	R	R	R	R	R	R	R	
<b>Bacitracina</b>	R	R	R	R	R	R	R	
<b>GÉNERO Y ESPECIE</b>	<i>S. saprophytico</i>	<i>S. saprophytico</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. saprophytico</i>	<i>Micrococcus spp</i>	<i>S. viridans</i>	
O:Oxidativo		K: alcalino		G: No coagula		+: Positivo		
F: Fermentativo		A: Acido		SG: Si coagula		-: Negativo		
I:Inerte		R: Resistente		S: Sensible		C/F: Crecimiento/fermentación		

Realizado por: GUALLPA, S., 2016

En la Tabla 12-3 se muestra los resultados obtenidos con las diferentes pruebas bioquímicas realizadas a los clones aislados, (cocos Gram Positivos), observándose que la mayoría de clones resultaron ser catalasa positiva, oxidasa variable, O/F de glucosa son fermentativos e inerte, el único clon oxidativo de glucosa fue el clon P4-5, Kliger variable, Urea positivo, NaCl 6,5% negativo, las colonias P2-1, P2-12, P3-14 Y P3-19 fermentaron en Agar Manitol, en la mayoría de los clones la resistencia la Optoquina fue variable, los clones P2-2 y P2-10 resultaron ser sensibles a la Novobiocina. El clon P4-5 fue el único clon que resulto ser oxidativo. La temperatura óptima de crecimiento fue de 35°C.

**Tabla 13-3:** Pruebas bioquímicas del clon aislado (bacilos Gram positivo) de las aguas Termales del Balneario “Cununyacu”.

PRUEBAS											MEDIOS DE CULTIVO		GÉNERO Y ESPECIE	
Origen	Punto de Muestreo	N° Clon	Catalasa	Oxidasa	Hugh Lefsonn	Kliger	Citrato	Urea	SIM			H. Almidón		H. Gelatina
									Indol	M	H <sub>2</sub> S			
A, mesof.	A	3-1	+	+	I	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>Bacillus spp</i>
I: Inerte			O: Oxidativo			F: Fermentativo								

Realizado por: GUALLPA, S., 2016

En la Tabla 13-3 se observa los resultados obtenidos para el clon aislado P3-1, que resultó ser bacilo Gram positivo, catalasa positiva, oxidasa positiva, O/F de la glucosa fue inerte, Kliger negativo, citrato negativo, SIM negativo, Urea negativo, la hidrolisis del almidón fue positiva con la formación del halo, la temperatura optima de crecimiento fue de 35°C dando como resultado la identificación del clon bacteriano siendo este *Bacillus spp*.

En el año 2001, De la Rosa et al., realizo un estudio del agua mineromedicinal del balneario “El Paraíso” reportaron el aislamientos de bacilos Gram positivos de genero *Bacillus spp*. ) Estudios realizados por Mosso et al., en el año 2002 en las aguas mineromedicinales del Balneario de Alhama de Granada y en el 2006 en las aguas mineromedicinales del Balneario

Cervantes se reportaron el aislamiento de microorganismos de genero *Bacillus spp.* Estos resultados coinciden con los realizado en el Balneario Cununyacu, teniendo en cuenta que el Genero *Bacillus spp.* Procede del suelo y puede ser arrastrado por el agua llegando a las piscinas del balneario.

**Tabla 14-3.** Pruebas bioquímicas de clones aislados (bacilos Gram negativos) de las aguas Termales del Balneario “Cununyacu”.

CLON		P1-20	P1-24	P1-44	P3-10	
ORIGEN	<b>Petriefilm</b>	Aerobios totales	<i>Eosina Azul de Metileno</i>	<i>E. coli coliformes</i>	Aerobios totales	
	<b>Punto de muestreo</b>	A	C	D	B	
	<b>Tinción Gram</b>	Bacilo (-)	Bacilo (-)	Bacilo (-)	Bacilo (-)	
PRUEBAS	<b>Catalasa</b>	-	+	+	+	
	<b>Oxidasa</b>	+	+	+	-	
	<b>Hugh Leifsonn</b>	I	O	O	I	
	<b>KLIGLER</b>	K/K	K/K	K/K	K/K	
	SIM	<b>Movilidad</b>	-	+	-	-
		<b>Indol</b>	-	-	-	-
		<b>H<sub>2</sub>S</b>	-	-	-	-
	<b>UREA</b>	-	+	+	+	
	<b>CITRATO</b>	+	+	+	+	
	<b>Mac Conkey</b>	+	+	+	+	
	<b>EAM</b>	+	+	+	+	
<b>SS</b>	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento		
<b>GENERO Y ESPECIE</b>	<i>Alcaligenes faecalis</i>	<i>Brevundinomas diminuta</i>	<i>Brevundinomas diminuta</i>	<i>Aeromonas schubertii</i>		
<b>O:</b> Oxidativo		<b>C:</b> Crecimiento				
<b>F:</b> Fermentativo		<b>K:</b> Alcalino				
<b>I:</b> Inerte						

Realizado por: GUALLPA, S., 2016

En la tabla 14-3 se muestra los resultados de las pruebas que se realizaron a los clones aislados bacilos Gram negativos, en donde se reporta que existió catalasa variable, oxidasa variable, la prueba O/F de glucosa son oxidativas e inertes, la temperatura de crecimiento fue de 35°C y existió el crecimiento en Agar MacConkey y en Eosina Azul de Metileno, no hubo crecimiento en el agar *Salmonella Shigella*. El clon P1-20 fue el único clon que dio urea negativa y catalasa positiva, el clon P1-24 presento movilidad, Indol negativo y todos los clones dieron citrato positivo.

### 3.11. Especies bacterianas identificadas del Balneario “Cununyacu”

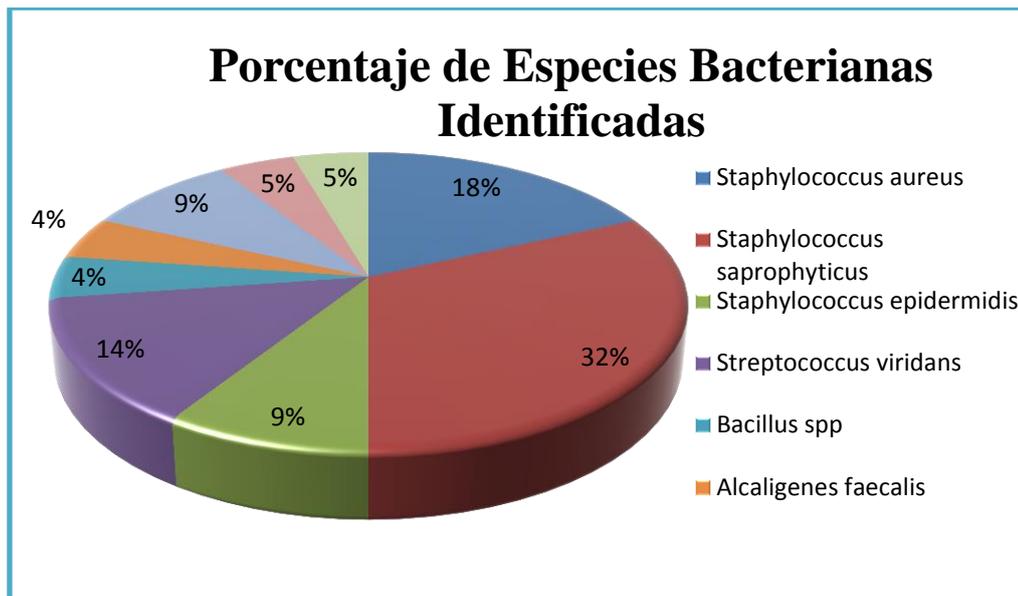
En la Tabla 15-3 se muestra las especies identificadas a partir de las aguas termales del Balneario “Cununyacu”, la identificación se realizó por métodos que se basaron en las características macroscópicas, microscópica y pruebas bioquímicas.

**Tabla 15-3:** Especie de Bacterias identificadas de las Aguas Termales del Balneario “Cununyacu”

Nº DE CLON AISLADO	BACTERIAS	PORCENTAJE DE COINCIDENCIA (%)	PORCENTAJE DE ESPECIES ENCONTRADAS EN EL BALNEARIO
	GÉNERO ESPECIE		
7	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	100%	32%
4	<i>Staphylococcus aureus</i>	100%	18%
3	<i>Streptococcus viridans</i>	77,77%	14 %
2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	83,33%	9 %
2	<i>Brevundimonas diminuta</i>	100%	9 %
1	<i>Aeromonas schubertii</i>	83,33%	5 %
1	<i>Alcaligenes faecalis</i>	91,6%	5%
1	<i>Micrococcus spp</i>	100%	4%
1	<i>Bacillus spp</i>	80%	4 %

Realizado por: GUALLPA, S., 2016

En el grafico 7-3 se presentan las bacterias viables heterótrofas y oligotrofas identificadas en el Balneario “Cununyacu” que corresponde a Cocos Gram positivos: *Staphylococcus aureus* en un (18%), *Staphylococcus saprophyticus* (32%), *Staphylococcus epidermidis* (9%), *Streptococcus viridans* (14%), *Micrococcus spp* (4%), un bacilo Gram positivo de genero *Bacillus spp.* (4%), y bacilos Gram negativos *Alcaligenes faecalis* (5%), *Brevundimonas diminuta* (9%), *Aeromonas schubertii* (5%).



**Gráfico 7-3:** Identificación de bacterias aisladas de las aguas termales del Balneario “Cununyacu”  
 Realizado por: GUALLPA. S.. 2016

La presencia de bacterias *Staphylococcus aureus* en el sitio A puede deberse a que el lugar del que emerge el agua está en contacto directo con el suelo, ocasionando que este microorganismo también se lo pueda encontrar en el sitio B, la presencia del microorganismo en el sitio E puede deberse a que es una especie que forma parte de la microbiota de la piel y mucosa y este sitio tiene contacto directo con los bañistas.

La bacteria *Staphylococcus epidermidis* fue encontrada en el sitio E que corresponde a la piscina pequeña lugar que está en contacto directo con los bañistas. La presencia del microorganismo puede deberse a que es una especie que forma parte de la microbiota de la piel, además de encontrarse en el ambiente este puede llegar a las piscinas a través del aire el suelo y la lluvia. (SEAS, C. 2003.pp 1-3)

El *Streptococcus viridans* es un microorganismo normal de la mucosa oral, respiratoria gastrointestinal de los mamíferos y del tracto genital en la mujer. En el presente estudio se encontró este microorganismo y puede deberse a que en los sitios donde existió la presencia del mismo, están en contacto directo con la naturaleza y con los usuarios que visitan el balneario. (FERNANDEZ, F. pp.2-7)

La bacteria *Micrococcus* se encuentra en la piel humana y en otros ambientes como el agua y el suelo y no son considerados patógenos. Este microorganismo fue encontrado en el presente estudio coincidiendo con los resultados obtenidos por Mosso et al., en el 2002, en el agua mineromedicinal del Balneario de Alhama en Granada.

Márquez (2007) realizó un estudio aislando bacterias del género *Bacillus* las cuales fueron encontrados en la microbiota del suelo. Al comparar los resultados obtenidos por Marquez con los del presente estudio podemos decir que el microorganismo encontrado en el sitio A perteneciente al ojo de agua proviene del suelo. De la Rosa et al., en el 2008 realizaron un estudio en el Balneario de Valdelateja el cual reportó la presencia del género *Bacillus* en pequeña proporción, coincidiendo con los resultados obtenidos en el presente estudio. (De la rosa et al., 2008 pg 63)

Estudios realizados en el Balneario El Paraíso de Manzanera por De la Rosa María et al. en el 2001 encontraron una cepa de bacterias Gram negativas que corresponde a un bacilo no fermentador de género *Alcaligenes*, este resultado coincide con lo reportado en el presente estudio ya que también hubo la presencia del microorganismo. En la industria se lo usa para la producción de aminoácidos no estándar. (De la Rosa et al., 2001. p.45)

En nuestro estudio se aisló la especie *Aeromonas schubertii*, la cual es un agente causal de infecciones intestinales siendo la diarrea su principal manifestación. Este microorganismo causa infecciones en heridas cuando la persona es expuesta a agua contaminada. Se lo encuentra en el agua, el suelo y muchos alimentos, especialmente en la carne y la leche. En nuestro estudio el microorganismo fue encontrado en el sitio B que corresponde al agua que proviene de los tubos, indicando que su presencia se debería a que el lugar de donde origina el agua está en contacto con el suelo. (KONEMAN, E., et al. 2008 pp. 541-545)

Otra especie que se logró identificar fue la *Brevundimonas diminuta*, el mismo se lo puede aislar del agua, suelo, plantas y ocasionalmente en especímenes clínicos. En estudios realizados por Mosso et al., 2011 en el Balneario de la Concepción, también se aisló esta bacteria coincidiendo con los resultados obtenidos en nuestro estudio. (Mosso et al., 2011 pp. 259-260)

**Tabla 16-3:** Bacterias encontradas en cada sitio muestreado del Balneario “Cununyacu”

LUGAR	N° CLON	GÉNERO Y ESPECIE
A	1-17	<i>Staphylococcus saprophytico</i>
	1-39	<i>Streptococcus viridans</i>
	2-1	<i>Staphylococcus aureus</i>
	3-1	<i>Bacillus spp</i>
	1-20	<i>Alcaligenes faecalis</i>
B	2-23	<i>Staphylococcus saprophytico</i>
	3-14	<i>Staphylococcus aureus</i>
	3-10	<i>Aeromonas schubertii</i>
C	1-22	<i>Staphylococcus saprophytico</i>
	1-32	<i>Staphylococcus saprophytico</i>
	1-33	<i>Staphylococcus saprophytico</i>
	4-24	<i>Streptococcus viridans</i>
	4-5	<i>Micrococcus spp</i>
	1-24	<i>Brevundimonas diminuta</i>
D	1-41	<i>Streptococcus viridans</i>
	2-2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
	2-10	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
	2-67	<i>Staphylococcus saprophytico</i>
	3-42	<i>Staphylococcus saprophytico</i>
	1-44	<i>Brevundimonas diminuta</i>
E	2-12	<i>Staphylococcus aureus</i>
	3-19	<i>Staphylococcus aureus</i>

Realizado por: GUALLPA, S., 2016

En la tabla 16-3 se muestra los microorganismos que fueron encontrados en cada sitio muestreado, pudiéndose observar que la mayor diversidad fue encontrada en el sitio A (ojo de agua), segundo del sitio C y D con cuatro microorganismo diferentes, luego el sitio B con la presencia de tres microorganismo diferentes y finalmente el sitio E con una sola clase de microorganismo.

### 3.12. Susceptibilidad de los clones aislados de las aguas termales del balneario “Cununyacu” frente a diversos antibióticos.

Este estudio se realiza mediante el antibiograma, que mide la sensibilidad de una bacteria frente a diferentes antimicrobianos, herramienta muy importante en nuestro trabajo, ya que nos permite determinar la efectividad que tiene los antibióticos contra los microorganismos.

**Tabla 17-3:** Antibiograma de Cocos Gram positivos de las aguas termales del Balneario “Cununyacu”

N° Clon	Nombre	ANTIBIOTICOS													
		AMC 20/10	IMP 10	CN 10	CRO 30	KF 30	AM 10	CIP 5	E 15	OXA 1	K 30	F 300	TE 30	VA 30	P 10
1-17	<i>Staphylococcus saprophytico</i>	R	S	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
1-22	<i>Staphylococcus saprophytico</i>	S	S	R	S	R	R	S	R	R	I	R	I	R	R
1-32	<i>Staphylococcus saprophytico</i>	R	S	I	R	R	R	S	I	R	I	R	I	R	R
1-33	<i>Staphylococcus saprophytico</i>	R	S	R	R	R	R	S	I	R	R	R	R	R	R
1-39	<i>Streptococcus viridans</i>	R	S	R	S	R	R	S	I	R	S	S	S	R	R
1-41	<i>Streptococcus viridans</i>	S	S	S	S	I	S	S	S	R	I	R	S	R	R
2-1	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
2-2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	S	S	S	R	S	R	S	R	R	S	S	S	S	R
2-10	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R
2-12	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	S	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R
2-23	<i>Staphylococcus saprophytico</i>	R	S	R	S	R	R	S	R	R	I	R	S	R	R
2-67	<i>Staphylococcus saprophytico</i>	S	S	R	S	R	I	S	R	R	R	R	R	R	R
3-14	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	R
3-19	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	S	R	R	S	R	R	I	R	S	S	R
3-42	<i>Staphylococcus saprophytico</i>	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	R	I	R	R
4-5	<i>Micrococcus spp</i>	R	S	S	R	R	R	S	I	R	S	R	S	R	R
4-24	<i>Streptococcus viridans</i>	R	S	R	S	S	R	S	R	R	R	R	S	S	R
Resistente: R		Sensible: S				Medianamente sensible: MS					Intermedio: I				
Amoxicilina/Ac. Clavulánico 20/10µg: AMC 30		Vancomicina 30µg: µg: VA 30				Oxacilina 1µg: OXA 1									
Imipenem 10µg: IMP 10		Eritromicina 15µg: E 15				Kanamicina 30µg: K 30									
Gentamicina 10µg: CN 10		Penicilina 10µg: P 10				Nitrofurantoina 300µg: F 300									
Ceftriaxona 30µg: CRO 30		Ampicilina 10µg: AM 10				Tetraciclina 30µg: TE 30									
Cefalotina 30µg: KF 30		Ciprofloxacina 5µg: CIP 5													

Realizado por: GUALLPA, S., 2

La evaluación del efecto de los antibióticos (Tabla 17-3) (Amoxicilina/Ac. Clavulánico: AMC, Imipenem: IMP, Gentamicina: CN, Ceftriaxona: CRO, Cefalotina: KF, Ampicilina: AM, Ciprofloxacina: CIP, Oxacilina: OX, Kanamicina: K, Nitrofurantoina: F, Tetraciclina: TE, Vancomicina: VA, Eritromicina: E, Penicilina: P) sobre los clones aislados, muestran resultados variables ya que todos los microorganismos resultaron ser sensibles al imipenem y a la ciprofloxacina, la oxacilina y la penicilina son los antibióticos que no presentan actividad inhibitoria ante ningún microorganismo. Del total de 17 clones aislados pertenecientes a cocos positivos, 15 presentaron sensibilidad intermedia a los antibióticos gentamicina, cefalotina, ampicilina, eritromicina, kanamicina, y tetraciclina.

Dos (12%) de los 17 clones aislados pertenecientes a la especie *Staphylococcus saprophytico* presentaron resistencia a 11 de los 14 antibióticos, 2 (12%) de los 17 microorganismos identificados presentaron resistencia a 10 antibióticos, 3 (18%) de los 17 clones aislados presentaron resistencia a 9 antibióticos, 4 (24%) de los 17 microorganismos identificados resultaron ser resistentes a 8 antibióticos, 2 (12%) de los 17 aislados bacterianos presentaron resistencia ante 7 antibióticos, 2 (12%) de los 17 aislados bacterianos presentaron resistencia ante 4 antibióticos, 1 (5%) de los 17 aislados bacterianos presentaron resistencia ante 5 antibióticos y 1 (5%) de los 17 aislados bacterianos presentaron resistencia ante dos antibióticos.

De los 7 *Staphylococcus saprophytico* que identificamos del balneario, 2 (28%) presentan sensibilidad a la Amoxicilina/Ac. Clavulánico, 1 (14%) presenta una sensibilidad intermedia a la gentamicina, 4 (57%) presentan una sensibilidad a la ceftriaxona, únicamente 1(14%) presenta una sensibilidad a la ampicilina, 2 (28%) presentan sensibilidad intermedia a la eritromicina y 1(14%) presenta sensibilidad a la eritromicina, 3 (43%) presenta sensibilidad a la kanamicina, ninguno presenta sensibilidad a la nitrofurantoina a la vancomicina y a la cefalotina, 3 (43%) presentan sensibilidad intermedia y 1(14%) sensibilidad a la tetraciclina.

De los 4 *Staphylococcus aureus* encontrados en el balneario, el 100% fueron sensibles a la Amoxicilina/Ac. Clavulánico, a la ceftriaxona, todos presentaron resistencia a la gentamicina, ampicilina, 3 (75%) presentaron resistencia a la cefalotina ya a la eritromicina, 1 sensibilidad a la cefalotina y a la eritromicina, 2 (50%) presentan sensibilidad intermedia y sensibilidad a la Kanamicina, 3 (75%) presentaron resistencia y 1 (25%) sensibilidad a la nitrofurantoina, 3

(75%) presentaron sensibilidad y 1 (25%) resistencia a la tetraciclina, 2 (50%) presentaron sensibilidad a la vancomicina.

De los 3 *Streptococcus viridans* encontrados e identificados, 2 (66%) presentan resistencia y 1 (34%) sensibilidad a la Amoxicilina/Ac. Clavulánico, gentamicina, ampicilina, nitrofurantoina y a la vancomicina, el 100% presenta sensibilidad a la ceftriaxona, 1 (33%) presentan sensibilidad, 1(33%) sensibilidad intermedia y 1 (33%) resistencia a la cefalotina, eritromicina y a la kanamicina.

De los 2 *Staphylococcus epidermidis* encontrados el 100% presentan sensibilidad a la Amoxicilina/Ac. Clavulánico, gentamicina, cefalotina, kanamicina, nitrofurantoina, tetraciclina y vancomicina, y el 50% presentan resistencia y el otro 50% presentan sensibilidad a ceftriaxona, eritromicina y ampicilina.

El *Micrococcus spp* encontrado en el balneario presenta sensibilidad a la Genamicina, kanamicina y a la teraciclina, y resistencia a Amoxicilina/Ac. Clavulánico, ceftriaxoba, cefalotina, ampicilina, nitrifurantoina y kanamicina, presenta sensibilidad intermedia a la eritromicina.

En la tabla 18-3 el *Bacillus spp* encontrado en el balneario resulto ser sensible a la cirpofloxacina, eritromicina y a la vancomicina, una sensibilidad intermedia a la nitrofurantoina y tetraciclina y presenta resistencia a la Amoxicilina/Ac. Clavulánico, Imipenem, Gentamicina, Ceftriaxona, Cefalotina, Ampicilina, penicilina y sensibilidad inermedia a la nitrofurantoina y tetraciclina.

**Tabla 18-3:** Antibiograma del Bacilo Gram positivos de las aguas termales del Balneario “Cununyacu”

Clon	Nombre	ANTIBIOTICOS													
		AMC 20/10	IMP 10	CN 10	CRO 30	KF 30	AM 10	CIP 5	E 15	OXA 1	K 30	F 300	TE 30	VA 30	P 10
3-1	<i>Bacillus spp</i>	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	I	I	S	R
Resistente: R		Sensible: S				Medianamente sensible: MS				Intermedio: I					
Amoxicilina/Ac. Clavulánico 20/10µg: AMC 30						Oxacilina 1µg: OXA 1									
Imipenem 10µg: IMP 10						Kanamicina 30µg: K 30									
Gentamicina 10µg: CN 10						Nitrofurantoina 300µg: F 300									
Ceftriaxona 30µg: CRO 30						Tetraciclina 30µg: TE 30									
Cefalotina 30µg: KF 30						Vancomicina 30µg: µg: VA 30									
Ampicilina 10µg: AM 10						Eritromicina 15µg: E 15									
Ciprofloxacina 5µg: CIP 5						Penicilina 10µg: P 10									

Realizado por: GUALLPA, S., 2016

**Tabla 19-3:** Antibiograma de los Bacilos Gram negativos de las aguas termales del Balneario “Cununyacu”

Clon	Nombre	ANTIBIOTICOS												
		AMC 30	IMP 10	CN 10	CRO 30	KF 30	AM 10	CIP 5	SXT 25	PY 100	K 30	F 300	TE 30	S 300
1-20	<i>Alcaligenes faecalis</i>	S	S	S	S	R	R	S	R	S	S	R	S	S
1-24	<i>Brevundinomas diminuta</i>	R	S	S	S	R	R	S	R	R	S	R	S	S
1-44	<i>Brevundinomas diminuta</i>	R	S	S	S	R	R	S	R	R	S	R	R	S
3-10	<i>Aeromonas schubertii</i>	R	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S
Resistente: R		Sensible: S				Medianamente sensible: MS					Intermedio: I			
Amoxicilina/Ac. Clavulánico 20/10µg: AMC 30		Trimetoprim/sulfametoxazol 1,25/23,75mcg: SXT 25												
Imipenem 10µg: IMP 10		Carbenicilina 100µg: PY 100												
Gentamicina 10µg: CN 10		Kanamicina 30µg: K 30												
Ceftriaxona 30µg: CRO 30		Nitrofurantoina 300µg: F 300												
Cefalotina 30µg: KF 30		Tetraciclina 30µg: TE 30												
Ampicilina 10µg: AM 10		Estreptomomicina 300µg: S 300												
Ciprofloxacina 5µg: CIP 5														

Realizado por: GUALLPA, S., 2016

La evaluación del efecto de los antibióticos (Amoxicilina/Ac. Clavulánico: AMC, Imipenem: IMP, Gentamicina: CN, Ceftriaxona: CRO, Cefalotina: KF, Ampicilina: AM, Ciprofloxacina: CIP, Trimetoprim/sulfametoxazol: SXT Carbenicilina: PY, Kanamicina: K, Nitrofurantoina: F, Tetraciclina: TE, Estreptomicina: S) sobre los clones identificados bacilos negativos muestran variación en sus resultados (Tabla 18-3), ya que los aislados bacterianos resultaron ser resistentes a la cefalotina y ampicilina, y sensibles al imipenem, gentamicina, ceftriaxona, ciprofloxacina, kanamicina y estreptomicina

El *Alcaligenes faecalis* presenta resistencia a la nitrofurantoina y Trimetoprim/sulfametoxazol, ampicilina y nitrofurantoina y sensibilidad a los demás antibióticos.

De las *Brevundinomas diminuta* encontradas en el balneario, 1 (50%) presenta resistencia y 1 (50%) sensibilidad a la tetraciclina, presentan resistencia a la Amoxicilina/Ac. Clavulánico, cefalotina, ampicilina, Trimetoprim/sulfametoxazol, carbenicilina y nitrofurantoina y sensibilidad a los demás antibióticos.

La *Aeromonas schubertii* encontrada en el balneario presenta resistencia a la Amoxicilina/Ac. Clavulánico, cefalotina ampicilina y sensibilidad a Imipenem, Gentamicina, Ceftriaxona, Ciprofloxacina, Trimetoprim/sulfametoxazol, Carbenicilina, Kanamicina, Nitrofurantoina, Tetraciclina, Estreptomicina.

La resistencia que presentan algunos microorganismos puede relacionarse con la presencia de microorganismos autóctonos los mismos que pueden proceder de los bañistas y ocasionar que los genes de resistencia de estos microorganismos sean transmitidos a las bacterias propias del agua mediante plásmidos, transportones o integrones, esto nos indica que el microorganismo no es inhibido *in vitro* por el antibiótico en una dosis normal, siendo su éxito terapéutico mínimo o nulo. (Manual de actualización en resistencia bacteriana y normas CLSI M100-S20, 2010, p.12)

La susceptibilidad intermedia se refiere a que cuando el microorganismo presenta una Concentración Inhibitoria Mínima del agente antimicrobiano cercana a los niveles de antibiótico usualmente alcanzados en sangre o tejidos y para los cuales la respuesta puede ser más baja que para los aislamientos susceptibles. La categoría intermedia implica la eficacia clínica en sitios del cuerpo donde el fármaco es concentrado fisiológicamente o cuando se puede utilizar una dosis más alta de lo normal. (Manual de actualización en resistencia bacteriana y normas CLSI M100-S20, 2010, p.12)

Los microorganismos que presentaron susceptibilidad a los antibióticos, indican que el microorganismo es inhibido por las concentraciones alcanzadas por el agente antimicrobiano, existiendo una gran probabilidad de éxito terapéutico de la infección. . (Manual de actualización en resistencia bacteriana y normas CLSI M100-S20, 2010, p.12)

En un estudio realizado en las aguas de los manantiales la Mitisús y Santa Apolonia del estado de Mérida los resultados mostraron que todos los clones son resistentes a amoxicilina/ácido clavulánico, así también todos los clones resultaron ser sensibles a la gentamicina. En nuestro estudio los resultados coinciden ya que algunos de los clones fueron resistentes a la amoxicilina/ácido clavulánico al igual que la gentamicina. (Flores, S., 2013)

En el estudio realizado en los manantiales de agua en la Región de Al-Ahsa publicado por Alzahrani y col. Se aislaron cepas de *Escherichia coli* en el cual de un total de 26 cepas, 15 mostraron resistencia a la ampicilina, cloranfenicol, estreptomina, tetraciclina, cotrimoxazol, ácido nalidíxico y ciprofloxacina. En nuestro estudio no se encontró el mismo microorganismo pero se hizo uso de los antibióticos mencionados dando como resultado que algunos de los clones presentan resistencia a estos antibióticos y coincidiendo con el estudio hecho por Alzahrani. (ALZHRANI, A. 2011, p. 124)

CASTRO R. et al., 2010 realizaron un estudio titulado *Staphylococcus aureus* meticilino resistente en niños escolares de Cartagena de Indias, en el cual los discos usados para la prueba de sensibilidad fueron Oxacilina, Eritromicina, Clindamicina, Tetraciclina, Ciprofloxacina y Vancomicina, de las 33 cepas aisladas, 9 presentaron resistencia a la oxacilina, y sensibilidad a los demás antibióticos. Al contrastar con nuestro estudio podemos decir que los resultados coinciden los del estudio ya que ningún microorganismo presentó sensibilidad a la Oxacilina, mientras que para los demás antibióticos usados sí existió sensibilidad.

PAJUELO. J et al., en el 2006 realizaron un estudio sobre el Perfil de sensibilidad y resistencia de *Staphylococcus aureus* en el Hospital Nacional Hipólito Unanue, el cual se estudiaron 127 cepas de este microorganismo. En la realización del análisis de susceptibilidad los resultados arrojados fueron que existe un patrón de resistencia a la oxacilina, gentamicina, amikacina y ciprofloxacina, mientras que hubo sensibilidad a la vancomicina, al contrastar con los resultados obtenidos en el presente estudio, podemos observar que existe similitud en cuanto al patrón de resistencia que se dio ante la oxacilina, gentamicina y existió sensibilidad a la vancomicina y a la ciprofloxacina.

Rubio. C. et al., 2007, realizaron un estudio titulado Sensibilidad a antibióticos betalactámicos, glucopéptidos y aminoglucósidos en cepas comensales de *Streptococcus* alfa-hemolíticos, en donde aislaron 190 cepas de *Streptococcus* alfa-hemolíticos dando como resultado que el *Streptococcus* es resistente a la penicilina, y son sensibles a vancomicina, teicoplanina y gentamicina, cuatro cepas de *Streptococcus* presentaron resistencia a la estreptomina y tres a la kanamicina, en nuestro estudio los resultados varían, indicando que dos de los tres clones de *Streptococcus* presentan resistencia a la gentamicina y vancomicina, mientras que ante la kanamicina dos de los tres clones resultaron ser sensibles.

FARIA, José et al., 2001, realizaron un estudio sobre la resistencia a los antimicrobianos de la especie *Bacillus* el cual fue aislado de la leche, los resultados obtenidos mostraron que 69 *Bacillus* resultaron resistentes a la penicilina, oxacilina y amoxicilina/ácido clavulánico y los antibióticos que inhibieron el crecimiento fueron los aminoglucósidos, fluoroquinolonas, eritromicina. Al comparar con los resultados de nuestro trabajo podemos decir que coinciden con los del estudio, ya que el *Bacillus spp* presenta resistencia a la penicilina, oxacilina y amoxicilina/ácido clavulánico y presentan sensibilidad a la eritromicina ciprofloxacina, mientras que difieren en cuanto a la kanamicina y gentamicina ya que presentan resistencia.

GALLEGOS, et al., realizaron un estudio de sensibilidad antimicrobiana usando 35 antibióticos, en los cuales el género *Bacillus spp* presentó mayor sensibilidad al cloranfenicol, amikacina, doxicilina, kanamicina, tetraciclina, ampicilina y novobiocina. Los resultados no concuerdan con los obtenidos en el presente estudio, ya que el *Bacillus spp* encontrado en el Balneario “Cununyacu” presentó resistencia a la kanamicina, oxacilina, ampicilina, y únicamente concordó con la sensibilidad a la tetraciclina.

ATENCIO, L, et al., en el 2007 realizaron un estudio sobre la resistencia de los *Micrococcus sp.* aislados de quesos provenientes de expendios comerciales del estado Zulia, Venezuela. En el cual fueron aisladas 29 cepas de *Micrococcus sp* resultando ser resistente a la eritromicina. Los resultados no coinciden con los de nuestro estudio, ya que el *Micrococcus sp* presentó sensibilidad intermedia a la eritromicina.

RESTREPO M, et al. (2010) llevaron a cabo un estudio titulado Artritis reactiva asociada con bacteriemia por *Brevundimonas diminuta* en el mismo realizaron un perfil de aislamientos de especies de *Brevundimonas* de los Centros para Control de Enfermedades de los Estados Unidos y susceptibilidad a los aminoglucósidos, con resistencia importante a ampicilina, así como susceptibilidad variable a penicilinas, antipseudomonas y cefalosporinas de tercera generación.

Al contrastar con nuestro estudio podemos observar que los resultados obtenidos de la *Brevundimonas diminuta* concuerdan con la resistencia a la ampicilina pero no coinciden con la resistencia a la ciprofloxacina ya que en nuestro trabajo los dos clones encontrados presentaron sensibilidad.

En un estudio realizado por Nuñez Lidia, et al. (2012) titulado Bacterias resistentes a antibióticos en aguas grises como agentes de riesgo sanitario, en el cual los aislamientos resistentes encontrados fueron bacilos Gram-negativos no fermentadores como la *Stenotrophomonas maltophilia*, *Acinetobacter spp*, *Alcaligenes faecalis*. y *Psychrobacter phenylpyruvicus*. En los perfiles de resistencia observamos que la resistencia a algunos antibióticos es natural como la resistencia de *S maltophilia* a meropenem y *Alcaligenes faecalis* a gentamicina. En nuestro estudio el *Alcaligenes faecalis* encontrado fue sensible a la gentamicina lo que indica que no concuerda con el estudio realizado por Nuñez Lidia y colaboradores.

Laura Bravo, et al. (2011) Realizaron un estudio titulado Caracterización fenotípica y factores de virulencia en cepas de *Aeromonas* aisladas de pacientes con enfermedad diarreica aguda en Cuba, las 54 cepas estudiadas mostraron el perfil bioquímico característico, quedando ubicadas en el género *Aeromonas* familia *Aeromonadaceae*. Al analizar la susceptibilidad in vitro a antimicrobianos de las 54 cepas de *Aeromonas* analizadas encontramos un predominio de cepas resistentes a penicilina, amoxicilina, ampicilina, carbenicilina y cefalotina. Mientras que mostraron sensibilidad ante la amikacina, aztreonam, ceftazidima, ceftriaxona, ciprofloxacina y gentamicina. Los resultados concuerdan con los de nuestro estudio ya que la *Aeromonas schubertii* encontrada en el Balneario Cununyacu presentó resistencia a la amoxicilina y a la cefalotina mientras que fue sensible a la ciprofloxacina y ceftriaxona.

## CONCLUSIONES

- Se determinó los parámetros *in-situ* de las aguas termales del Balneario “Cununyacu”, el mismo presento en el primer muestreo una temperatura promedio de 27,9 °C, una temperatura ambiente de 18°C y un valor pH igual a 7, en el segundo muestreo el agua presento una temperatura de 28 °C, una temperatura ambiente de 22 °C y un valor de pH igual a 7, en ambos casos la temperatura supera los 5°C sobre la temperatura ambiente, confirmando que se trata de aguas termales.
- En el punto de muestreo A se encontraron Aerobios Mesofilos  $1,40 \times 10^2$  UFC/mL, coliformes fecales  $7,0 \times 10^0$  UFC/mL, coliformes totales  $1,79 \times 10^0$  UFC/mL, bacterias del genero *Staphylococcus aureus*  $5,0 \times 10^0$  UFC/mL, ausencia de mohos, y un valor promedio de  $8,0 \times 10^0$  UFC/mL, de levaduras.
- En el punto de muestreo B se encontraron Aerobios Mesofilos  $3,07 \times 10^2$  UFC/mL, coliformes fecales  $6,0 \times 10^0$  UFC/mL, coliformes totales  $3,578 \times 10^2$  UFC/mL, bacterias del genero *Staphylococcus aureus*  $5,0 \times 10^0$  UFC/mL, ausencia de mohos, y un valor promedio de  $4,0 \times 10^0$  UFC/mL, de levaduras.
- En el punto de muestreo C se encontraron Aerobios Mesofilos  $1,251 \times 10^3$  UFC/mL, coliformes fecales  $6,6 \times 10^1$  UFC/mL, coliformes totales  $5,32 \times 10^2$  UFC/mL, bacterias del genero *Staphylococcus aureus*  $3,5 \times 10^0$  UFC/mL, ausencia de mohos, y un valor promedio de  $1,0 \times 10^1$  UFC/mL, de levaduras.
- En el punto de muestreo D se encontraron Aerobios Mesofilos  $2,620 \times 10^3$  UFC/mL, coliformes fecales  $3,2 \times 10^1$  UFC/mL, coliformes totales  $1,998 \times 10^3$  UFC/mL, bacterias del genero *Staphylococcus aureus*  $3,0 \times 10^0$  UFC/mL, ausencia de mohos, y un valor promedio de  $4,1 \times 10^1$  UFC/mL, de levaduras.
- En el punto de muestreo E se encontraron Aerobios Mesofilos  $2,513 \times 10^3$  UFC/mL, coliformes fecales  $2,65 \times 10^1$  UFC/mL, coliformes totales  $6,345 \times 10^2$  UFC/mL, bacterias del genero *Staphylococcus aureus*  $1,2 \times 10^1$  UFC/mL, ausencia de mohos, y un valor promedio de  $1,0 \times 10^1$  UFC/mL, de levaduras.

- En el presente estudio se aislaron un total de 180 clones bacterianos, de los cuales 94 (52%) resultaron ser clones Gram positivas, 78 (43%) resultaron ser clones Gram negativas y 8 (5%) clones contaminados.
- Las especies bacterianas Gram positivas identificadas fueron 7 *Staphylococcus saprophyticus* (32%), 3 *Streptococcus viridans* (14 %), 2 *Staphylococcus epidermidis* (9%), 1 *Staphylococcus aureus* (18%), 1 *Micrococcus spp* 4%, solamente una especie del genero bacilo Gram positivo 1 *Bacillus spp* (4 %), y finalmente 4 bacterias Gram negativas, 1 *Alcaligenes faecalis* (5%), *Brevundimonas diminuta* (9%), 1 *Aeromonas schubertii* (5%).
- En cuanto a la susceptibilidad de los antibióticos las bacterias *Bacillus spp.* presento sensibilidad a la vancomicina eritromicina, y ciprofloxacina y una sensibilidad intermedia a la tetraciclina y nirofurantoina.
- En cuanto a los cocos positivos los antibióticos imipenem y ciprofloxacina, presentaron actividad inhibitoria para todos los microorganismos, todos los aislados bacterianos resultaron ser resistentes a la oxacilina y penicilina. La vancomicina presento actividad inhibitoria para el *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* y para una especie de *Streptococcus viridan*, la tetraciclina presento actividad inhibitoria ante 3 de los 7 *Staphylococcus saprophyticus*, y para 1 de los 4 *Staphylococcus aureus*. De las especies aisladas los dos *Staphylococcus epidermidis* , 1 *Staphylococcus aureus* y 1 *Streptococcus viridan*, presentaron sensibilidad ante la nirofurantoina y cefalotina. La especie *Staphylococcus epidermidis*, 2 de las 4 especies de *Staphylococcus aureus* y 1 de las 2 especies de presentaron ser sensibles a la kanamicina *Streptococcus viridan*, fueron resistentes a la kanamicina. Tan solo 1 especie de *Streptococcus viridan*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus* presentan sensibilidad ante la eritromicina. La ampicilina presento actividad inhibitoria ante 1 especie de *Streptococcus viridan* y 1 especie de *Staphylococcus epidermidis*. El género *Micrococcus spp* presento sensibilidad ante la gentamicina, kanamicina y tetraciclina. La Amoxicilina/Ac. Clavulánico, presento actividad inhibitoria ante el *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* , dos especies de *Staphylococcus saprophyticus*, y 1 especie de *Streptococcus viridan*. La ceftriaxona no presenta actividad inhibitoria frente a 3 microorganismos *Staphylococcus saprophyticus*, 1 *Staphylococcus epidermidis* y al *Micrococcus spp.*

- En cuanto a las especies Gram negativas identificadas los antibióticos Imipenem, Gentamicina, Cirpofloxacina, Ceftriaxona, Kanamicina y Estreptomicina presentaron actividad inhibitoria en todas las especies, los microorganismos resultaron ser resistentes a los antibióticos Cefalotina y Ampicilina. Los géneros *Alcaligenes faecalis* y *Brevundimonas diminuta* fueron resistentes a la trimetoprin/sulfametoxazol y a la nirofurantoina. La amoxicilina /Ac. Clavulanico presento únicamente actividad inhibitoria ante el *Alcaligenes faecalis* y la *Brevundimonas diminuta* y la *Aeromonas schubertii* fueron resistentes. La carbenicilina presento actividad inhibitoria ante la *Aeromonas schubertii* y *Alcaligenes faecalis*, la tetraciclina presento actividad inhibitoria ante la *Aeromonas schubertii* y *Alcaligenes faecalis* y a 1 de las 2 especies encontradas de *Aeromonas schubertii*.

## RECOMENDACIONES

- Tomar las acciones pertinentes que ayuden a identificar las causas de la contaminación de las aguas termales, ya que si se trata de un pozo séptico las personas que están a cargo del Balneario deberán solicitar la mejora de la infraestructura del mismo para evitar que estas aguas estén en contacto con las aguas que se dirigen al balneario.
- El agua termal al ser de uso terapéutico y recreacional, es fundamental que haya controles microbiológicos constantes ya que de esta manera se podrá evitar cualquier riesgo para el usuario y salvaguardar su seguridad.
- Mejorar la limpieza de las piscinas, ya que fueron los lugares en donde hubo el mayor número de crecimiento de microorganismos.
- Se recomienda que los bañistas antes de ingresar al agua cumplan algunas normas, como ducharse, usar traje de baño, gorro, sandalias,
- Se recomienda que en el balneario se implementen duchas cerca de las piscinas, para que los bañistas puedan ducharse cada vez que vayan a ingresar a la piscina.
- En el Ecuador se debería contar con una legislación de las aguas termales en donde se implanten los requisitos técnicos sanitarios que deben cumplir para su funcionamiento.

## BIBLIOGRAFÍA

**3M España S.A.** *Guía de interpretación.* [en línea] 3M™ Petrifilm™ 2009 [Consulta: 2 de Julio del 2016]. Disponible en [http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat/workshopmrama/files/Pet\\_rifilm\\_guias.pdf](http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat/workshopmrama/files/Pet_rifilm_guias.pdf)

**AGUIRRE, Paulina; & ALVARADO, Mariela.** *Termas la Florida, nuevo destino turístico en la Provincia del Azuay* [en línea] (Tesis) Escuela Superior Politécnica del Litoral, Ecuador. 2007 pp 29-34. [Consulta: 23 DE Agosto del 2016]. Disponible en: <file:///C:/Users/User/Downloads/D-36118.pdf>

**APELLA, MA; & ARAUJO, P.** *Microbiología de agua. Conceptos básicos.* [en línea]. España [Consulta: 12 de Julio del 2016]. Disponible en: <http://catedras.quimica.unlp.edu.ar/ingenieriabioquimicaIyII/microbiologia.pdf>

**ALVAREZ, M; et al.** *Manual de técnicas en microbiología clínica,* [en línea]. 2da. ed. Madrid-España. Asociación Española de Farmacéuticos Analistas, 1990, pp. 111-112 [Consulta: 12 de Julio del 2016]. Disponible en: <http://www.serbi.ula.ve/serbiula/librose/pva/Libros%20de%20PVA%20para%20libro%20digital/Manual%20de%20Bacteriologia.pdf>

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

**ATENCIO, Lorena,** Multiresistencia a antibióticos y patrón de plásmidos en *Micrococcus spp.* aislados de quesos provenientes de expendios comerciales del estado Zulia, Venezuel, *Revista científica SCIELO,* v.15 n°3(2007) (Maracaibo – Venezuela) pp. 1.

**AZNAR, Antonio.** “Determinación de los parámetros físico-químicos de la calidad de las agua”. *Gestión ambiental,* vol. 2, N° 23, 2008. Madrid-España. pp. 3-8. Disponible en: <http://ocw.uc3m.es/ingenieria-quimica/ingenieria-ambiental/otros-recursos-1/OR-F-001.pdf>

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

**BECTON DICKINSON.** *Salmonella shigella* [en línea] 2013 [Consulta: 23 de julio del 2016].  
Disponible en: <http://www.bd.com/resource.aspx?idx=8779>

**BOLETIN OFICIAL DE ESTADO,** *Real Decreto 742/2013, de 27 de septiembre: Criterios técnicos-sanitarios de la calidad del agua y del aire de las piscinas.* [en línea] 2013 [Consulta: 23 de julio del 2016]. Disponible en: <https://www.boe.es/boe/dias/2013/10/11/pdfs/BOE-A-2013-10580.pdf>

**BOQUET, Ernesto., et al.**, Identificación microbiana. *Manual de Técnicas en Microbiología Clínica.* España. Garsi: 1995. pp. 44-148.

**BORJA, Jackelyn et al.** “*Bacterias halotolerantes productoras de hidrolasas aisladas de aguas termales de Tarapoto*”. [en línea] Ciencia e Investigación, vol. 15, N° 2, 2013. [Consulta: 04 de Julio del 2016] Tarapoto-Perú. pp. 66-70. Disponible en: <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/farma/article/view/2659/2326>

**BRAVO L, et al.** Caracterización fenotípica y factores de virulencia en cepas de Aeromonas aisladas de pacientes con enfermedad diarreica aguda en Cuba [en línea]. ] *Revista Científica SCIELO* Vol. 28, N° 2, 2011. [Consulta: 04 de Agosto del 2016] La Habana, Cuba. pp. 159-165. Disponible en: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0716-10182011000200009](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182011000200009)

**BRITANIA.** *Discos de Bacitracina 0.04 U* [en línea]. 2010. [Consultado: 26 de Julio del 2016]. Disponible en: [http://www.britanialab.com/productos/196\\_hoja\\_tecnica\\_es.pdf](http://www.britanialab.com/productos/196_hoja_tecnica_es.pdf)

**BRITANIA.** *Agar Mueller Hinton* [en línea]. 2010. [Consultado: 26 de Julio del 2016]. Disponible en: <http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/muellerhintonagar.htm>

**BRITANIA.** *E.M.B AGAR.* [en línea]. 2010. [Consultado: 2016-07-26]. Disponible en: [http://www.britanialab.com/productos/229\\_hoja\\_tecnica\\_es.pdf](http://www.britanialab.com/productos/229_hoja_tecnica_es.pdf)

**BURBANO, N et al.** Aguas termominerales del Ecuador: INAMHI. [en línea] Quito-Ecuador. 2013. pp. 6-13. [Consultado: 26 de Julio del 2016]. Disponible en: <http://issuu.com/inamhi/docs/termalismo>

**BUSTOS, Jaime; et al,** *Staphylococcus aureus: la reemergencia de un patógeno en la comunidad* [en línea]. 2006. [Consultado: 26 de Agosto del 2016]. Disponible en: <http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb061746.pdf>

**CASTRO, Raimudo; et al,** *Staphylococcus aureus meticilino resistente en niños escolares de Cartagena* [en línea] Cartagena Colombia, 2 de Mayo del 2010. [Consulta: 20 de Octubre del 2016]. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/25331/1/22678-78379-1-PB.pdf>

**CAMARENA, Juan., SÁNCHEZ, Roberto.;** “Departamento de Microbiología”. Infección por *Staphylococcus aureus resistente a meticilina*.(en línea). Valencia. [Consultado: 2015 - 04 -12]. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/sarm.pdf>

**CARBAJAL, Angeles.; GONZAES, María** *Propiedades y funciones biológicas del agua* [en línea] Departamento de Nutrición, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, [Consulta: 03 de Julio del 2016]. Disponible en: <https://www.ucm.es/data/cont/docs/458-2013-07-24-Carbajal-Gonzalez-2012-ISBN-978-84-00-09572-7.pdf>

**CENDERANO, E; CANTON Rafael.;** *Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología* [en línea] Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 2010, [Consultado: 22 de Junio del 2016]. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf>

**CENDERANO, E & SAAVEDRA J.;** *El antibiograma. Interpretación del antibiograma: conceptos generales* [en línea] Servicio de Microbiología. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid España. 2009 [Consultado: 22 de Junio del 2016]. Disponible en: [http://appswl.elsevier.es/watermark/ctl\\_servlet?\\_f=10&pidet\\_articulo=80000504&pidet\\_usuario=0&pcontactid=&pidet\\_revista=51&ty=35&accion=L&origen=apcontinua](http://appswl.elsevier.es/watermark/ctl_servlet?_f=10&pidet_articulo=80000504&pidet_usuario=0&pcontactid=&pidet_revista=51&ty=35&accion=L&origen=apcontinua)

da&web=www.apcontinuada.com&lan=es&fichero=v7n4a404pdf001.pdf&anuncioPdf  
=ERROR\_publi\_pdf

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

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

**DE LA ROSA, J. et al.** “Diversidad microbiana de las aguas minerales termales”. *Panorama Actual de las Aguas Minero-medicinales en España.*, vol. 64, n° 3 (2000), (Madrid-España), Pp. 153-157.

**DE LA ROSA et al.** “Microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario “El Paraíso” de Manzanera”. *Anales de la real academia nacional de farmacia*. Vol. 67, (2001), (España) pp. 36-46.

**DE LA ROSA et al.** “Microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario “Alicúm de las Torres”. *Anales de la real academia nacional de farmacia*. Vol. 75, (2009), (España) pp. 767-778.

**DE LA ROSA et al.** “Microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario “Puente Viesgo”. *Anales de la real academia nacional de farmacia*. Vol. 73, (2007), (España) pp. 251-263.

**FAGUNDO, J. et al.** *Historia del desarrollo del Termalismo y Termalismo Moderno* [en línea]. Habana-Cuba., Conferencias impartidas en el curso de termalismo, Centro Nacional de Medicina Natural y Tradicional, 2000., Pp. 2-5. [Consulta: 27 DE Julio del 2016]  
Disponible en:  
[http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/mednat/curso\\_de\\_termalismo.pdf](http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/mednat/curso_de_termalismo.pdf)

**FAGUNDO J. et al.**, *Aguas Naturales, minerale y mineromedicinales* [en línea]. 2004 [Consulta: 27 de Julio del 2016] Disponible en:  
<http://www.sld.cu/sitios/mednat/docs/aguas.pdf>

**FAGUNDO J; et al.**, *Revisión bibliográfica sobre la clasificación de las aguas mineromedicinales* [en línea]. Centro nacional de termalismo “Víctor Santamarina” 2004 [Consulta: 27 de Julio del 2016] Disponible en: [http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/rehabilitacionbal/clasificacion\\_aguas\\_minerales.pdf](http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/rehabilitacionbal/clasificacion_aguas_minerales.pdf)

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

**FASEB J.** “*Ribosomal RNA: a key to phylogeny*”. Universidad de Illinois [en línea], (1993) Illinois-USA, vol 7, n°1, pp: 113-23. [Consulta: 01 de Agosto del 2016]. Disponible en: <http://academic.uprm.edu/~lrios/4368/Olsen-Woese.pdf>

**FERNANDEZ, Fernando**, “*Aspectos microbiológicos de los estreptococos del grupo viridans*”, [en línea]. Servicio de Microbiología. Ciutat Sanitària Universitària de Bellvitge. [Consulta: 20 de octubre del 2016]. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisiostematicas/bacteriologia/SGVirid.pdf>

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

**FLORES, Sandra.** Aislamiento, identificación y detección de microorganismos, con actividades biológicas, procedentes de las aguas de los manantiales termales LA MITISÚS y SANTA APOLONIA del estado Mérida. [en línea], (Tesis) (Maestría). Universidad de los Andes, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Mérida-Venezuela. 2013, pp. 5; 39; 161. [Consultado: 19 de Agosto del 2016]. Disponible en: <http://javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis249.pdf>

**GARAY J; et al.**, *Manual de técnicas analíticas de parámetros fisicoquímicos y contaminantes marinos*. [en línea] Centro de Investigaciones Oceanográficas e Hidrográficas, Cartagena – Colombia 1993 [Consultado: 19 de Agosto del 2016]. Disponible en: <http://www.invemar.org.co/redcostera1/invemar/docs/7010manualTecnicasanaliticas.pdf>

**GAD Tumbaco.** *Parroquia Tumbaco* [en línea]. Quito-Ecuador, 2014. [Consulta: 06 de Julio del 2016]. Disponible en: <http://www.tumbaco.gob.ec/web/turismo/lugares-que-visitar/balneario-municipal-cununyacu>

**GAD Tumbaco.** *Balneario Tumbaco* [en línea]. Quito-Ecuador, 2014. [Consulta: 06 de Julio del 2016]. Disponible en: <http://www.tumbaco.gob.ec/web/turismo/lugares-que-visitar/balneario-municipal-cununyacu>

**GREENFACTS.** *Resistencia a los antibióticos: causas, consecuencias y formas de contenerla* [en línea]. Quito-Ecuador, 2014. [Consulta: 06 de Julio del 2016]. Disponible en: <http://www.greenfacts.org/es/resistencia-antibioticos/index.htm>

**GUZMAN, M. & BERNAL M.,** *Antibiograma de discos, normalización de la técnica de Kirby- Bauer* [en línea] vol. 4, N° 3-4 .Biomédica 1984. [Consultado: 2016-07-27]. Disponible en: [file:///D:/Users/usuario/Downloads/1891-7206-1-SM%20\(1\).pdf](file:///D:/Users/usuario/Downloads/1891-7206-1-SM%20(1).pdf)

**INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN. NORMA TÉCNICA ECUATORIANA NTE INEN 2178:2011.,** *Aguas. Minerales. Aguas. Minerales Naturales Fecha de confirmación 2012-10-29.,* [en línea]. Quito-Ecuador., 2012., p. 8. [Consulta: 26 -07- 20016]. Disponible en: <https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.2178.2011.pdf>

**KONEMAN, E; et al.** *Diagnóstico microbiológico: texto y atlas color*, 6<sup>ta</sup>. Ed. Madrid-España, Médica panamericana, 2008. pp. 955-1030.

**KLIGLER HIERRO AGAR.** Britanialab. [en línea]. 2010. [Consultado: 2016-07-27]. Disponible en: <http://britanialab.com.ar/esp/productos/b02/kliglerhierroagar.htm>

**LABORATORIOS BRITANIA** *OF medio basal de Hugh & Leifson* [en línea]. 2010. [Consultado: 26 de julio del 2016]. Disponible en: [http://www.britanialab.com/productos/580\\_hoja\\_tecnica\\_es.pdf](http://www.britanialab.com/productos/580_hoja_tecnica_es.pdf)

**LLOPIS, María del Mar.** *Bajo la mirada de Heracles: El agua se torna fuente de salud y placer.* Barcelona-España. Erasmus. 2013. p. 161.

- MAC CONKEY AGAR.** Laboratorios Britania. [en línea]. 2010. [Consultado: 2016-07-26]. Disponible en: <http://www.britanialab.com/productos/B23114%20REV%2001-MAC%20CONKEY%20AGAR.pdf>
- MACFADDIN, J.** *Pruebas de la Hidrólisis del Almidón.*, 3ra ed., Buenos Aires-Argentina., Médica Panamericana., 2000., Pp. 385-393
- MACFADDIN, J.** *Pruebas bioquímicas para la Identificación de bacterias de importancia clínica.* 3ª edición. Buenos Aires-Argentin: 2003, pp. 470, 595-632, 676-682
- MADIGAN, M; MARTINKO, J; & PARKER, J.** *Biología de los microorganismos.* 10a ed. Madrid-España. Pearson-Prentice Hall. 2004. p. 56.
- MARAVÉ, Francisco.** *Vademécum de las Aguas Mineromedicinales* [en línea].España:2008 [Consulta: 17 de Agosto del 2016]. Disponible en: [http://pendientedemigracion.ucm.es/info/hidromed/fileadmin/user\\_upload/descargas/Vademecum-espanol.pdf](http://pendientedemigracion.ucm.es/info/hidromed/fileadmin/user_upload/descargas/Vademecum-espanol.pdf)
- MARÍN, R.** *Fisicoquímica y microbiología de los medios acuáticos: Tratamiento y control de calidad de aguas.* Madrid-España. Díaz de Santos, S.A. 2003. pp. 75-76; 122
- MEDIBAC.** *Medios de cultivo Agar Sangre* [en línea] 2015 [Consultado: 20 de Septiembre del 2016]. Disponible en: <http://www.labmedibac.com/wp-content/uploads/2015/04/AGAR-SANGRE-DE-CORDERO-MEDIBAC-LAB.pdf>
- MEDIBAC.** *Medios de cultivo Agar MacConkey* [en línea] 2015 [Consultado: 20 de Septiembre del 2016]. Disponible en: <http://www.labmedibac.com/wp-content/uploads/2015/04/AGAR-MAC-CONKEY-MEDIBAC-LAB.pdf>
- MÉNDEZ, A.** (2014). *Aguas Termales* [blog]. España, Blog. Ciencias-Médicas, 2014. [Consulta 14 de Agosto del 2016:]. Disponible en: <http://blog.ciencias-medicas.com/archives/853>
- MENDEZ, L.** *Clasificación Bacteriana* [en línea]. Argentina. UNPA, 2012. [Consulta: 18 Julio del 2016]. Disponible en: <https://books.google.com.ec/books?id=FYWSzy7EjR0C&printsec=frontcover&hl=es&>

source=gbs\_ge\_summary\_r&cad=0#v=onepage&q=hidr%C3%B3lisis%20almid%C3%B3n&f=false

**MONTAÑO, A. et al.**, *Los Microorganismos, pequeños gigantes* [en línea] Elementos 77 (2010) 15-23 [Consulta: 12 de Agosto del 2016]. Disponible en: <http://www.elementos.buap.mx/num77/pdf/15.pdf>

**MORA, Darner**, “Actualización de los criterios microbiológicos para evaluar la calidad del agua en sus diferentes usos” [en línea] *Revista Científica SCIELO*, vol.7, N° 13, 2006.Costa Rica 1998. [Consultado: 10 de Noviembre del 2016]. Disponible en: [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1409-14291998000200003](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-14291998000200003)

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

**MOSSO, M. et al.** “Microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario Valdelateja.”. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia.*, vol. 74, n° 3 (2011), (MadridEspaña), pp. 285-304.

**MOSSO, M. et al.** “Microbiología de las aguas mineromedicinales de Fuente Amarga.”. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia.*, vol. 17, n° 7 (1985), (Madrid-España), Pp. 17-22

**MOSSO, M. et al.** “Microbiología del agua mineromedicinal de los Balnearios de Alhama de Granada.”. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia.*, vol. 68, n° 1 (2002), (MadridEspaña), pp. 69-75.

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

**NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-127-SSA1-1994, "SALUD AMBIENTAL, AGUA PARA USO Y CONSUMO HUMANO; Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización".**[en línea] 2000. México [Consultado: 2 de Agosto del 2016]. Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/127ssa14.html>

**NORMA TECNICA COLOMBIANA.** *Agua potable.* [en línea] 2007 Colombia. [Consultado: 9 de Agosto del 2016]. Disponible en: [http://ingenieria.udea.edu.co/isa/normas\\_decretos/TEXTO%20NTC%20813%20AGUA%20POTABLE.pdf](http://ingenieria.udea.edu.co/isa/normas_decretos/TEXTO%20NTC%20813%20AGUA%20POTABLE.pdf)

**NUÑEZ L, et al,** Bacterias resistentes a antibióticos en aguas grises como agentes de riesgo sanitario Cátedra de Higiene y Sanidad, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina. [en línea] *Revista Científica SCIELO* vol. 7, n. 1, p. 235-243, 2012. [Consultado: 6 de Agosto del 2016]. Disponible en: <http://www.scielo.br/pdf/ambiagua/v7n1/v7n1a18.pdf>

**PAJUELO, Giovanni et al.** “Perfil de sensibilidad y resistencia de *Staphylococcus aureus*. Experiencia en el Hospital Nacional Hipólito Unanue”. [en línea] *Revista Científica SCIELO*, vol. 67, N° 2, 2006. Lima-Peru. pp. 245-248. [Consultado: 6 de Agosto del 2016]. Disponible en: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S102555832006000200004](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S102555832006000200004)

**PÍREZ M.; MOTA M.** *Morfología y estructura bacteriana.* [en línea] España, 2008. [Consulta: 12 de Septiembre del 2016]. Disponible en: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/MorfologiayEstructuraBacteriana.pdf>

**PFALLER M. et al.,** *Microbiología medica* [en línea] Madrid- España. 2007 [Consulta: 14 de Agosto del 2016]. Disponible en: [https://books.google.com.ec/books?id=ib7AiOFZE-0C&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q=Staphylococcus&f=false](https://books.google.com.ec/books?id=ib7AiOFZE-0C&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q=Staphylococcus&f=false)

**PRESCOTT, et al.,** *Microbiología.* 5ta Edición. España: Mc Graw-Hill. Interamericana. 2004 pp. 3-6.

**PRONADISA,** *Eosina Azul de Metileno* [en línea] 2010. [Consulta: 6 de Agosto del 2016]. Disponible en: [http://www.condalab.com/uploads/media/1039\\_AGAR\\_EOSINA\\_Y\\_AZUL\\_DE\\_METILENO\\_\\_AGAR\\_E.M.B\\_\\_REv\\_0\\_Abril\\_2010\\_01.pdf](http://www.condalab.com/uploads/media/1039_AGAR_EOSINA_Y_AZUL_DE_METILENO__AGAR_E.M.B__REv_0_Abril_2010_01.pdf)

**RESTREPO, Mauricio** et al. “Artritis reactiva asociada con bacteriemia por *Brevundimonas diminuta*”. [en línea] *Revista Colombiana de Reumatología*, vol. 17, N° 3, 2010. Medellín-Colombia. pp. 245-248. [Consultado: 2 de Agosto del 2016]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rcrc/v17n4/v17n4a06.pdf>

**RODRÍGUEZ, E.** (2005). *Bacteriología General: Principios y Prácticas de Laboratorio*. [en línea]. Costa Rica. [Consulta: 2015-04-07]. Disponible en: [http://books.google.com.ec/books?id=vwB0fgirgN0C&pg=PA3&hl=es&source=gb\\_s\\_to\\_c\\_r&cad=3#v=onepage&q&f=false](http://books.google.com.ec/books?id=vwB0fgirgN0C&pg=PA3&hl=es&source=gb_s_to_c_r&cad=3#v=onepage&q&f=false)

**RUBIO,;** et al., Sensibilidad a antibióticos betalactámicos, glucopéptidos y aminoglucósidos en cepas comensales de estreptococos alfa hemolíticos y *Gemella spp.* resistentes a eritromicina, *Revista ELSEVIER*, [en línea] 2008 (Zaragoza - España) pp. 1 [Consulta: 20 de Agosto del 2016]. Disponible en: <http://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-sensibilidad-antibioticos-betalactamicos-glucopeptidos-aminoglucosidos-S0213005X08726442>

**SALMONELLA-SHIGELLA.**, Laboratorios Britania. [en línea]. 2010. [Consultado: 26 de Julio del 2016]. Disponible en: <http://www.britanialab.com/productos/B02138%20REV%2001SALMONELLA%20SHIGELLA%20AGAR.pdf>

**SAMTAMBROSIO, Eduardo.**, *Tinción Gram y Observación de microorganismos*. [en línea] (2009). Universidad Tecnológica Nacional. Facultad Regional Rosario. Departamento de Ingeniería Química. Buenos Aires. pp. 2-5. [Consultado: 2016 -07 -26]. Disponible en: [http://www.fro.utn.edu.ar/repositorio/catedras/quimica/5\\_anio/biotecnologia/practico4.pdf](http://www.fro.utn.edu.ar/repositorio/catedras/quimica/5_anio/biotecnologia/practico4.pdf)

**SEAS, Carlos;** Bacteremia por *Staphylococcus epidermidis* y absceso de partes blandas en un paciente postoperado: Reporte de un caso. *Revista Médica Herediana Scielo*. [en línea] (Lima- Perú) pp. 1-3) [Consultado: 24 de Julio del 2016]. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rmh/v14n4/v14n4cc01.pdf>

**SEIJA, V. & VIGNOLLI, R.** *Principales grupos de antibióticos* [en línea] 2006 pp. 631-642 [Consultado: 24 de Julio del 2016]. Disponible en: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/BacteCEFA34.pdf>

**SEIJA, V. & VIGNOLLI, R.** *Principales mecanismos de resistencia a antibióticos* [en línea] 2008 pp. 650-652 [Consultado: 24 de Julio del 2016]. Disponible en: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/Principalesmecanismosderesistenciaantibiotica.pdf>

**SNOEYINK, V; & JENKINS, D.** *Química del agua*. México DF-México. Limusa. 1990. p. 15.

**VENDRELL, M. C. et al.,** *Estudio de microorganismos patógenos en la fuente termal de o tinteiro en Ourense* [en línea] Área de Microbiología. Facultad de Ciencias. Universidad de Vigo, Campus Orense. España. [Consulta: 13 de Septiembre del 2016]. Disponible en: <http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/11358129809487587>

**WIKIPEDIA, Org.** *Antibiótico*, [en línea] Fundacion Wikimedia. Inc. 2016 [Consulta: 13 de Agosto del 2016]. Disponible en: <https://es.wikipedia.org/wiki/Antibi%C3%B3tico>

**WORDPRESS.** *Enfermedades transmitidas por los alimentos*. [en línea] México, 2010. [Consulta: 13 de Agosto del 2016]. Disponible en: <https://avdiaz.files.wordpress.com/2010/02/encuentro-3.pdf>

**ZARAGOZA, Rafael; et al.** *Microbiología Aplicada al Paciente Crítico*. Madrid-España: Editorial Médica Panamericana S.A, 2008, pp. 55-5

## ANEXOS

### ANEXO A: Balneario de aguas Termales “Cununyacu”



**Fotografía N° 1:** Letrero del Balneario Cununyacu

Fuente: GUALLPA, S. 2016.



**Fotografía N°2:** Entrada principal del balneario Cununyacu.

Fuente: GUALLPA, S. 2015.



**Fotografía N° 3:** Acceso al Balneario

Fuente: GUALLPA, S. 2016.



**Fotografía N° 4:** Balneario Cununyacu

Fuente: GUALLPA, S. 2016.

### ANEXO B: Puntos de la toma de muestra para el Estudio Microbiológico.



**Fotografía N° 5:** Punto de Muestreo A (ojo de agua)

Fuente: GUALLPA, S. 2016.



**Fotografía N° 6:** Punto de muestreo B (tubos de agua)

Fuente: GUALLPA, S. 2016.



**Fotografía N° 7:** Punto de muestreo C (reservorio)  
**Fuente:** GUALLPA, S. 2016.



**Fotografía N° 8:** Punto de muestreo D (piscina grande).  
**Fuente:** GUALLPA, S. 2016.



**Fotografía N° 9:** Punto de muestreo E (Piscina Pequeña)  
**Fuente:** GUALLPA, S. 2016.

#### ANEXO C: Medición de los parámetros *in-situ*.



**Fotografía N° 10:** Determinación de parámetros físico-químicos del punto A  
**Fuente:** GUALLPA, S. 2016.



**Fotografía N° 11:** Determinación de parámetros físico-químicos del punto B  
**Fuente:** GUALLPA, S. 2016.



**Fotografía N° 12:** Determinación de parámetros físico-químicos del punto C.  
**Fuente:** GUALLPA, S. 2016.



**Fotografía N° 13:** Determinación de parámetros físico-químicos del punto D.  
**Fuente:** GUALLPA, S. 2016.



**Fotografía N° 14:** Determinación de parámetros físico-químicos del punto E.  
**Fuente:** GUALLPA, S. 2016.

#### **ANEXO D:** Recolección de la Muestra.



**Fotografía N° 15:** Recolección de muestra del ojo de agua.  
**Fuente:** GUALLPA, S. 2016.



**Fotografía N° 16:** Recolección de muestra de los tubos de agua.  
**Fuente:** GUALLPA, S. 2016.



**Fotografía N° 17:** Recolección de muestra, del reservorio.  
Fuente: GUALLPA, S. 2016.



**Fotografía N° 18:** Recolección de muestra, piscina grande.  
Fuente: GUALLPA, S. 2016.



**Fotografía N° 19:** Recolección de muestra, piscina grande.  
Fuente: GUALLPA, S. 2016.

**ANEXO E:** Siembra por el método de Petrifilm en las muestras A, B, C, D y E.

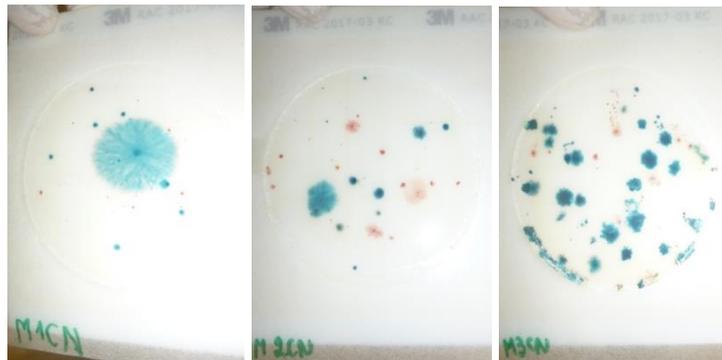


**Fotografía N° 20:** Materiales para la siembra por el método Petrifilm.  
Fuente: GUALLPA, S. 2016.

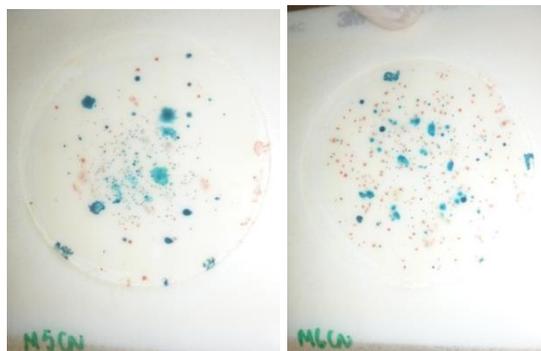


**Fotografía N° 21:** Siembra en Petrifilm para recuento de bacterias aerobias mesofilas, Mohos y levaduras, *E. coli*/coliformes, *Staphylococcus aureus*.  
Fuente: GUALLPA, S. 2016.

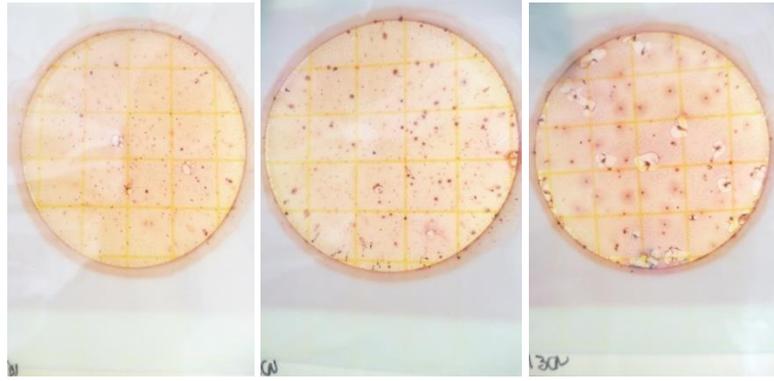
**ANEXO F:** (Primer muestreo) Resultados del recuento de bacterias de los sitios A, B, C, D y E, a las 24 horas, a una temperatura de 35°C.



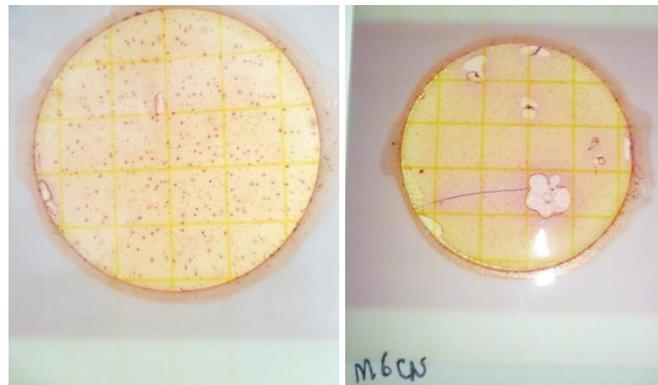
**Fotografía N° 22:** Placa de recuento de bacterias Aerobias Mesófilas, de las muestras A, B, y C.  
Fuente: GUALLPA, S. 2016.



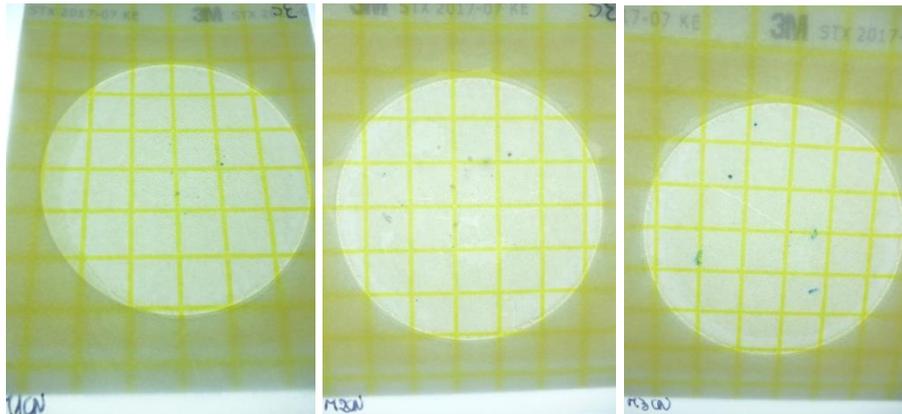
**Fotografía N° 23:** Placa de recuento de bacterias Aerobias Mesófilas, de las muestras D y E.  
Fuente: GUALLPA, S. 2016.



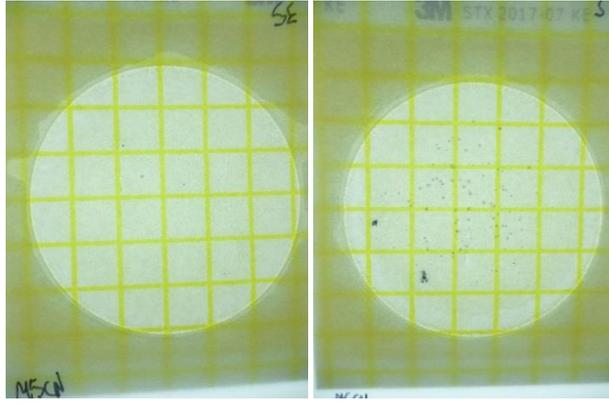
**Fotografía N° 24:** Placa de recuento de bacterias *E.Coli*/coliformes, de las muestras A, B y C.  
**Fuente:** GUALLPA, S. 2016.



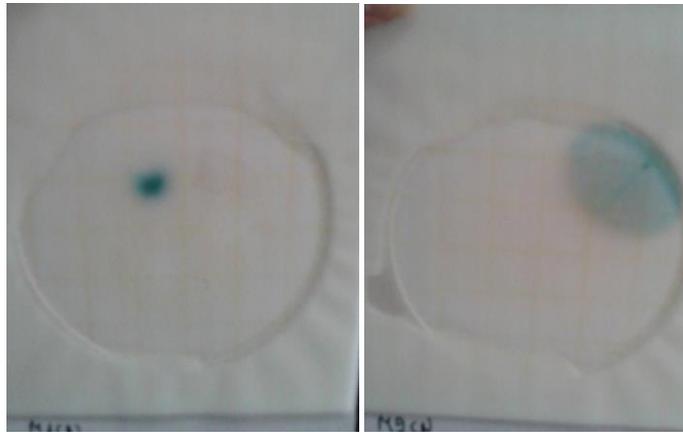
**Fotografía N° 25:** Placa de recuento de bacterias *E.Coli*/coliformes, de las muestras D y E.  
**Fuente:** GUALLPA, S. 2016.



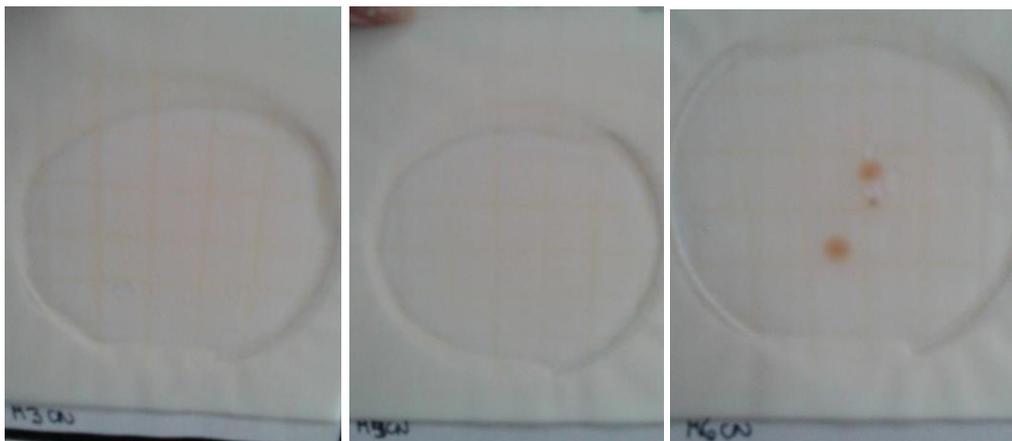
**Fotografía N° 26:** Placa de recuento de bacterias *S. aureus*, de las muestras A, B y C.  
**Fuente:** GUALLPA, S. 2016.



**Fotografía N° 27:** Placa de recuento de bacterias *S. aureus*, de las muestras D y E.  
Fuente: GUALLPA, S. 2016.

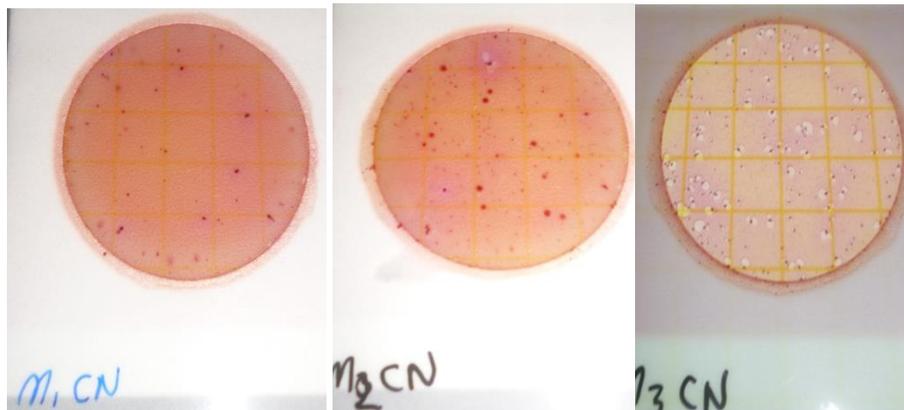


**Fotografía N° 28:** Placa de recuento de Mohos y levaduras de las muestras A y B  
Fuente: GUALLPA, S. 2016.

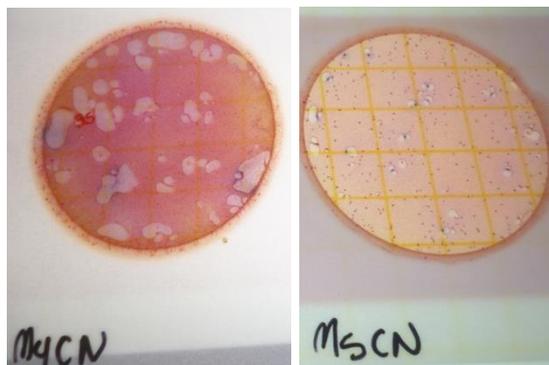


**Fotografía N° 29:** Placa de recuento de Mohos y levaduras de las muestras C, D y E  
Fuente: GUALLPA, S. 2016.

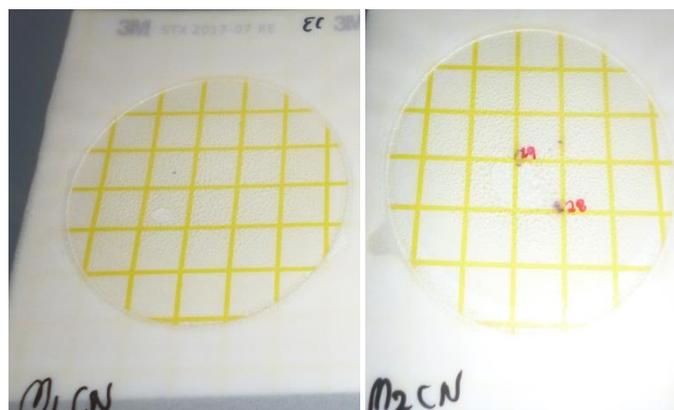
**ANEXO G:** (Segundo muestreo) Resultados del recuento de bacterias de los sitios A, B, C, D y E, a las 24 horas, a una temperatura de 35°C.



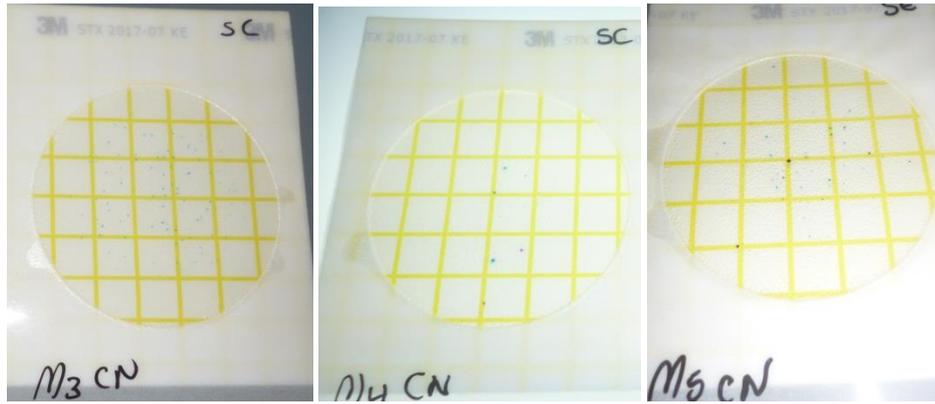
**Fotografía N° 30:** Placa de recuento de bacterias *E.Coli*/coliformes, de las muestras A, B y C.  
**Fuente:** GUALLPA, S. 2016.



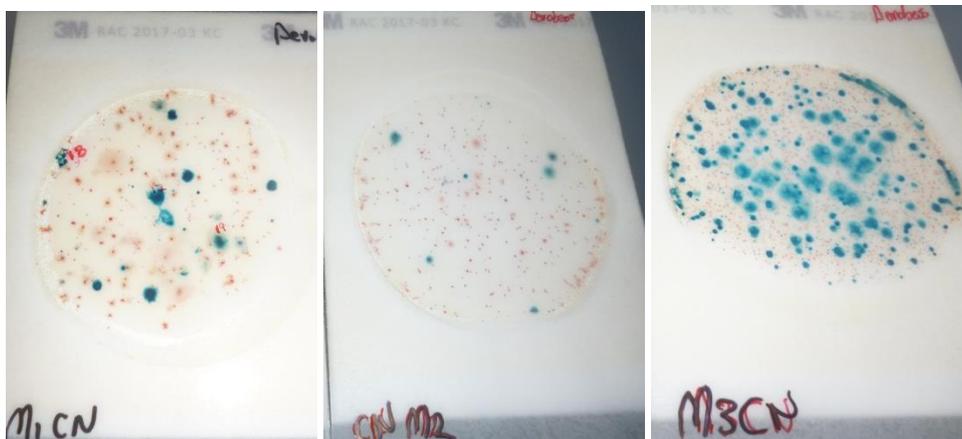
**Fotografía N° 31:** Placa de recuento de bacterias *E.Coli*/coliformes, de las muestras D y E.  
**Fuente:** GUALLPA, S. 2016.



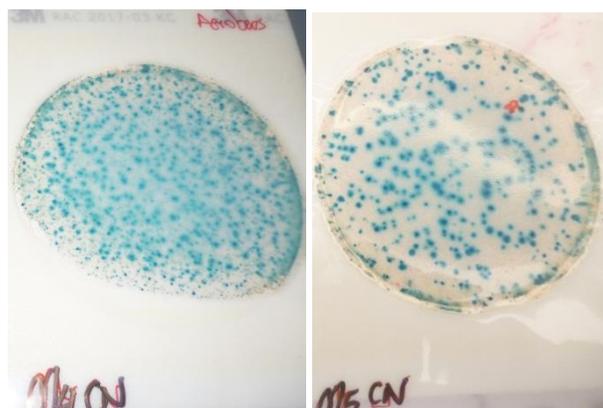
**Fotografía N° 32:** Placa de recuento de bacterias *S. aureus*, de las muestras A y B.  
**Fuente:** GUALLPA, S. 2016.



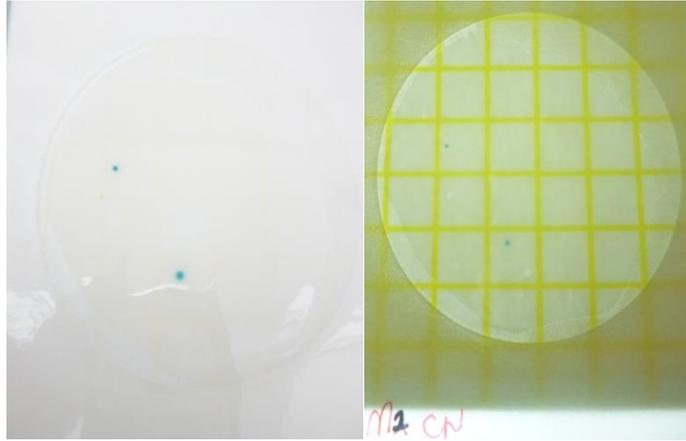
**Fotografía N° 33:** Placa de recuento de bacterias *S. aureus*, de las muestras, C, D y E.  
**Fuente:** GUALLPA, S. 2016.



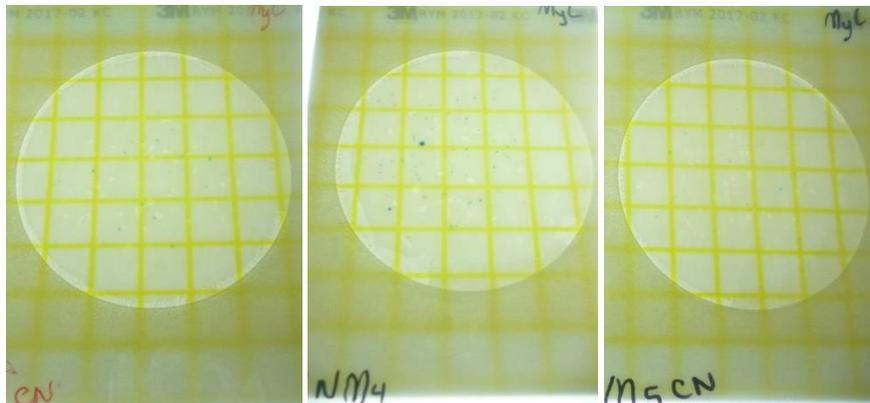
**Fotografía N° 34:** Placa de recuento de bacterias Aerobias Mesofilas , de las muestras, A, B y C.  
**Fuente:** GUALLPA, S. 2016.



**Fotografía N° 35:** Placa de recuento de bacterias Aerobias Mesofilas , de las muestras D y E.  
**Fuente:** GUALLPA, S. 2016.

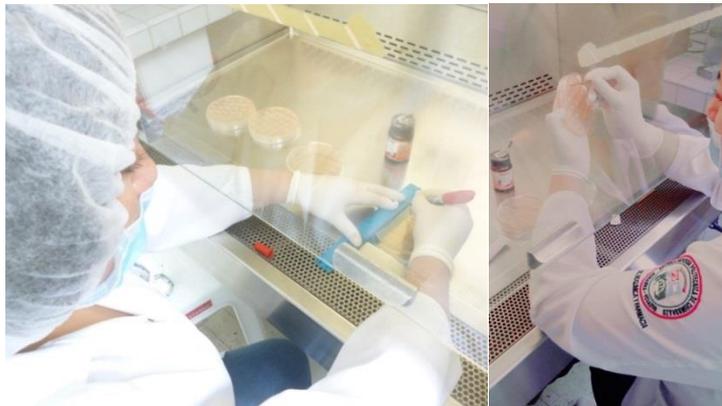


**Fotografía N° 36:** Placa de recuento de Mohos y levaduras de las muestras C, D y E.  
Fuente: GUALLPA, S. 2016.

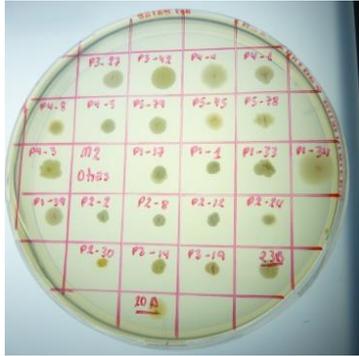


**Fotografía N° 37:** Placa de recuento de Mohos y levaduras de las muestras C, D y E.  
Fuente: GUALLPA, S. 2016.

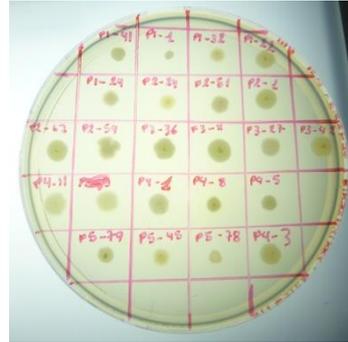
**ANEXO H:** Realización de repiques.



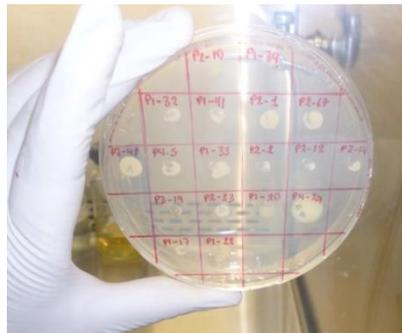
**Fotografía N° 38:** Repique 1  
Fuente: GUALLPA, S. 2016.



**Fotografía N° 39:** Repique 2  
Fuente: GUALLPA, S. 2016.

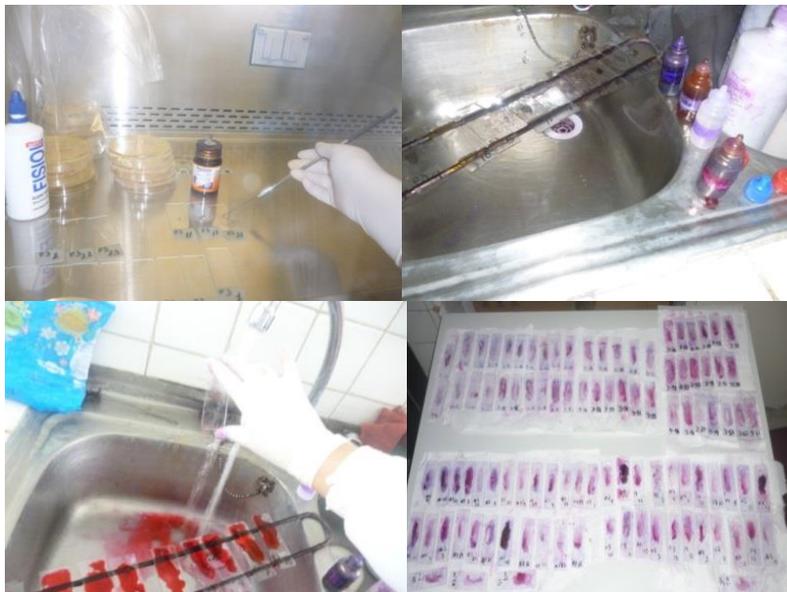


**Fotografía N° 40:** Repique 3  
Fuente: GUALLPA, S. 2016.



**Fotografía N° 41:** Repique 4  
Fuente: GUALLPA, S. 2016.

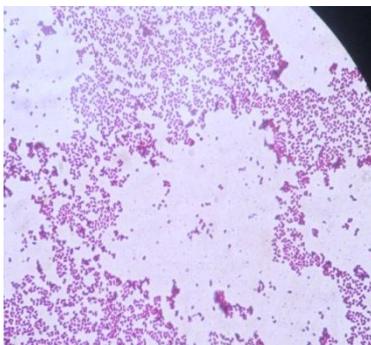
**ANEXO I:** Realización de la Tinción Gram.



**Fotografía N° 42:** Tinción Gram de los clones aislados  
Fuente: GUALLPA, S. 2016.



**Fotografía N° 43:** Observación Microscópica de las colonias  
**Fuente:** GUALLPA, S. 2016.



**Fotografía N° 44:** Cocos Gram positivos  
**Fuente:** GUALLPA, S. 2016.



**Fotografía N° 45:** Bacilo Gram positivo  
**Fuente:** GUALLPA, S. 2016.



**Fotografía N° 46:** Bacilos Gram negativos  
**Fuente:** GUALLPA, S. 2016.

**ANEXO J:** Prueba de la catalasa y oxidasa a clones aislados



**Fotografía N° 47:** Prueba de la Catalasa  
**Fuente:** GUALLPA, S. 2016.



**Fotografía N° 48:** Prueba de la Oxidasa para Cocos y Bacilos  
**Fuente:** GUALLPA, S. 2016.

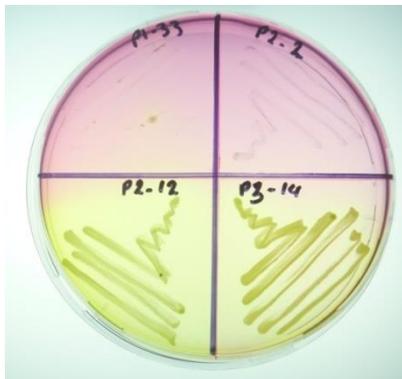
**ANEXO K:** Prueba de identificación para Cocos Gram positivos



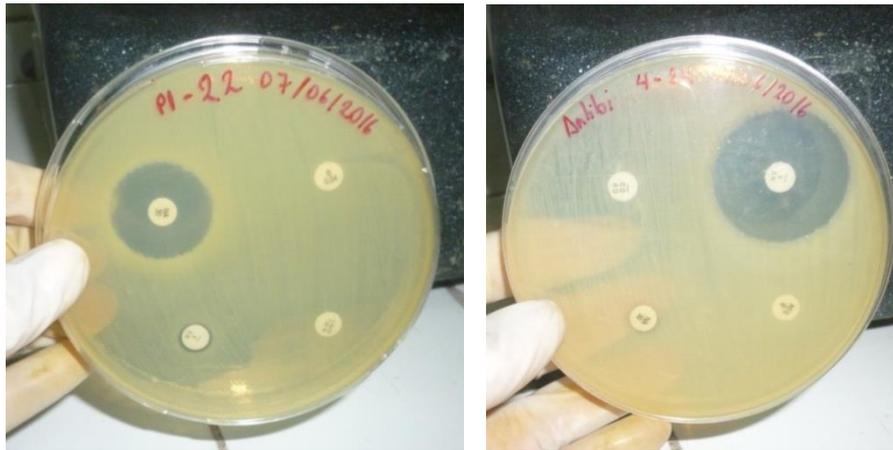
**Fotografía N° 49:** Colonias con hemolisis  $\beta$  y  $\gamma$   
**Fuente:** GUALLPA, S. 2016.



**Fotografía N° 50:** Colonias con hemolisis  $\gamma$  y  $\alpha$   
**Fuente:** GUALLPA, S. 2016.



**Fotografía N° 51:** Crecimiento y fermentación en Agar manitol Salado  
**Fuente:** GUALLPA, S. 2016.



**Fotografía N° 52:** Pruebas de sensibilidad a la Novobiocina, Bacitracina Optoquina, Acido Nalidixico  
**Fuente:** GUALLPA, S. 2016.



**Fotografía N° 53:** Resultado de las Pruebas bioquímicas Urea y Kligler  
**Fuente:** GUALLPA, S. 2016.

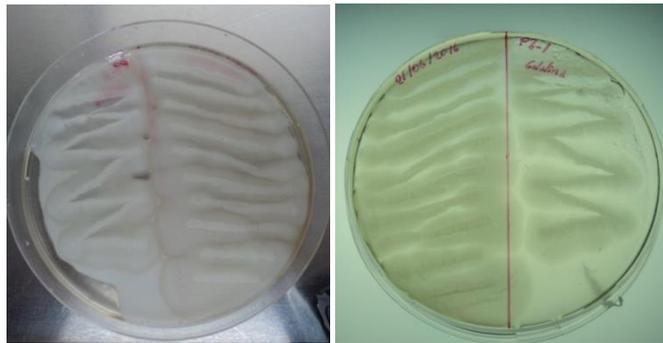


**Fotografía N° 54:** Resultado de las Pruebas O/F de Hugh Leifsson  
**Fuente:** GUALLPA, S. 2016.

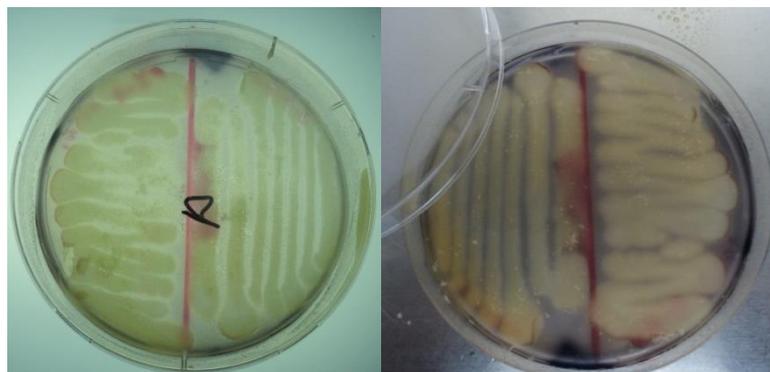


**Fotografía N° 55:** Prueba de la coagulasa.  
Fuente: GUALLPA, S. 2016.

**ANEXO L:** Prueba de identificación para Bacilos Gram positivos



**Fotografía 56:** Prueba negativa para Hidrolisis de la Gelatina  
Fuente: GUALLPA, S. 2016.



**Fotografía 57:** Prueba positiva para Hidrolisis del Almidón (Formación de halo)  
Fuente: GUALLPA, S. 2016.

**ANEXO M:** Prueba de identificación para Bacilos Gram negativos



**Fotografía 58:** Crecimiento de colonias en Agar Eosina Azul de Metileno



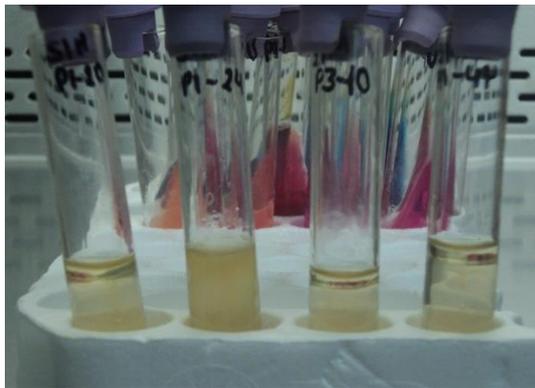
**Fotografía 59:** Ausencia de crecimiento de colonias en Agar *Salmonella Shigella*  
Fuente: GUALPA, S. 2016.



**Fotografía 60:** Crecimiento de colonias en Agar MacConkey.  
Fuente: GUALPA, S. 2016.



**Fotografía 61:** Resultado de las Pruebas O/F de Hugh Leifsson  
Fuente: GUALLPA, S. 2016.

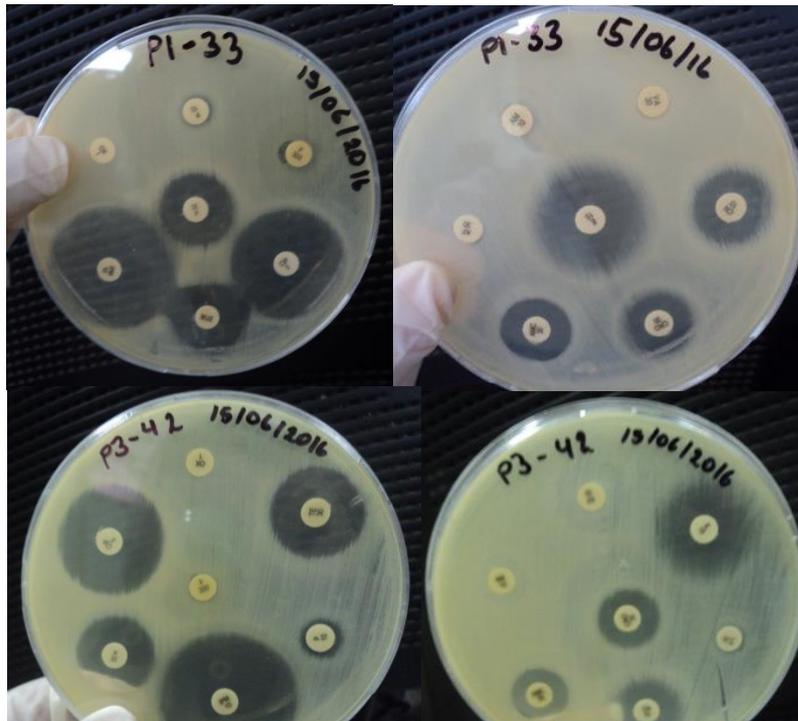


**Fotografía 62:** Pruebas bioquímicas (Indol Negativo)  
Fuente: GUALLPA, S. 2016.



**Fotografía 63:** Pruebas bioquímicas  
Fuente: GUALLPA, S. 2016.

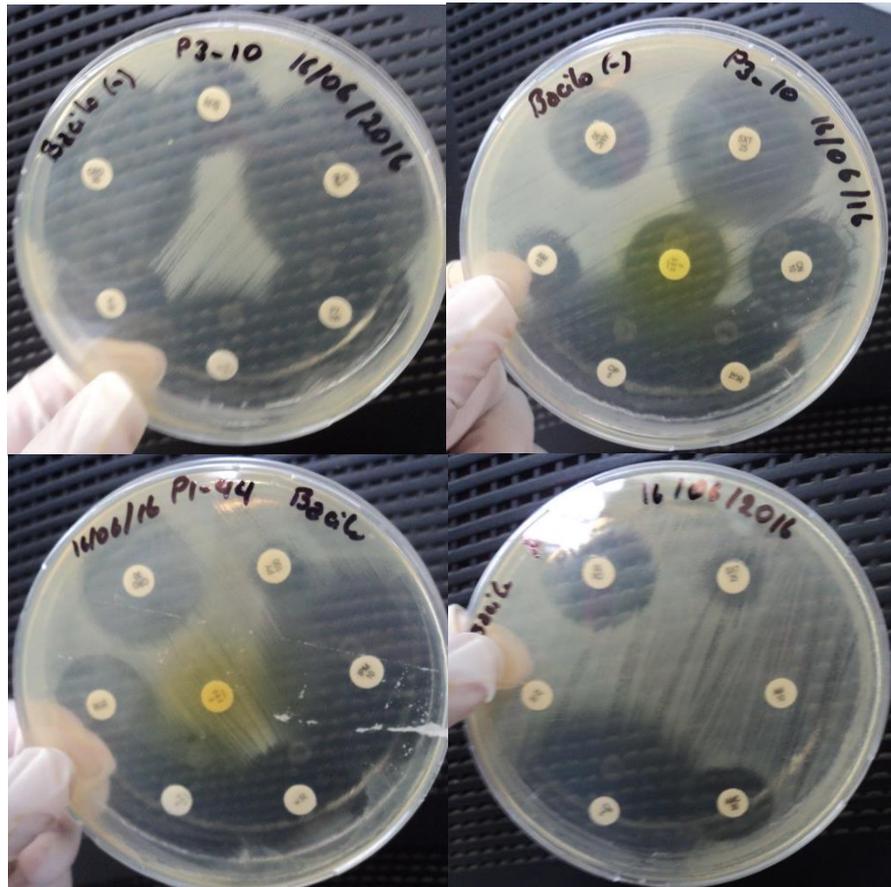
**ANEXO N:** Antibiogramas de las especies identificadas.



**Fotografía 64:** Realización de Antibiogramas para Cocos Gram positivos  
Fuente: GUALPA, S. 2016.



**Fotografía 65:** Realización de Antibiogramas para Bacilos Gram positivos  
Fuente: GUALPA, S. 2016.



**Fotografía 66:** Realización de Antibiogramas para Bacilos Gram negativos  
Fuente: GUALPA, S. 2016.

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.

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.
Nitrofurantoína	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.

**Fotografía 67:** Diámetro de las zonas patrón y su equivalencia con los puntos de ruptura de la concentración mínima de antimicrobianos que inhiben el crecimiento bacteriano.

Fuente: ALVAREZ, 1995