



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

**PERFILES DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA EN
BACTERIAS AISLADAS DEL AGUA DE CONSUMO EN LA
CIUDAD DE RIOBAMBA, PROVINCIA DE CHIMBORAZO**

Trabajo de titulación presentado para optar el grado de:

BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

AUTOR: ERIKA KARINA VARGAS FLORES

TUTOR: Dr. FÉLIX DANIEL ANDUEZA LEAL MSc. PhD

RIOBAMBA – ECUADOR

2015

©2015, Erika Karina Vargas Flores

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

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA CIENCIAS QUÍMICAS

El Tribunal del Trabajo de Titulación, certifica que: El trabajo de investigación: **PERFILES DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA EN BACTERIAS AISLADAS DEL AGUA DE CONSUMO EN LA CIUDAD DE RIOBAMBA, PROVINCIA DE CHIMBORAZO**, de responsabilidad de la señorita Erika Karina Vargas Flores, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Titulación, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Dr. Félix Andueza Msc. Phd
**DIRECTOR DE TRABAJO
DE TITULACIÓN**

Dra. Sandra Escobar

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Dr. Carlos Espinoza.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

**DOCUMENTALISTA
SISBIB ESPOCH**

Yo, Erika Karina Vargas Flores soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en este Trabajo de Titulación y el patrimonio intelectual del mismo pertenece a la Escuela Superior Politécnica De Chimborazo.

ERIKA KARINA VARGAS FLORES

DEDICATORIA

Mi tesis la dedico a Dios, por permitirme llegar a este momento tan especial en mi vida por darme la fortaleza y sabiduría para poder culminar felizmente mi trabajo.

También quiero dedicar con todo mi amor y cariño a mi amada madre Nelly Flores por ser la fuente de motivación e inspiración para poder superarme cada día más y por hacer de mí una mejor persona a través de sus consejos, enseñanzas y amor para así poder luchar en la vida hacia un futuro mejor.

A mi querido padre Guido Vargas por su sacrificio y esfuerzo, por darme los recursos necesarios para culminar mi carrera para mi futuro y por creer en mi capacidad.

A mis amados y queridos hermanos, Guido y Vanesa, quienes me impulsan a superarme y son mi fuente de motivación para seguir adelante, con perseverancia para así poder cumplir con mis ideales.

A mi amado novio Ángel Jácome por ser una parte especial e importante en mi vida, por su amor, cariño y comprensión que todos estos años me ha brindado, por ayudarme en toda mi carrera, darme ánimos en todo instante y compartir momentos inolvidables que ocupan un espacio especial en mi corazón.

A toda mi familia, ya que de todos recibí palabras de aliento, la importancia de continuar luchando y que las cosas que duran son siempre las que se consiguen con esfuerzo.

A mis maestros que formaron parte de mi vida estudiantil, y que aportaron con sus conocimientos para poder cumplir una etapa de mi vida. En especial a mi tutor Dr. Félix Andueza y mi colaboradora Dra. Sandra Escobar, gracias por su tiempo, por su apoyo así como por su sabiduría que me transmitieron en el desarrollo de mi trabajo.

A mis compañeras/os y amigas/os presentes y pasados, quienes sin esperar nada a cambio compartieron su conocimiento, alegrías y tristezas y a todas aquellas personas que durante mi trayecto estudiantil estuvieron a mi lado apoyándome y lograron que este sueño se haga realidad.

Gracias a todos.

AGRADECIMIENTO

El más sincero agradecimiento a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, en especial a la escuela de Bioquímica y Farmacia, por brindarme la oportunidad de obtener una profesión y ser una ayuda para la sociedad. A todos y cada uno de los profesores que tuve, que me enseñaron lo mejor de la carrera y de la Universidad.

De igual modo quiero agradecer a mi tutor Dr. Félix Andueza y mi colaboradora Dra. Sandra Escobar por sus recomendaciones y asesoramiento metodológico. Y a la Dra. Aida Fierro por su colaboración, tanto profesional como moral.

A mi familia por su apoyo y comprensión durante todos mis años de vida estudiantil.

Erika

TABLA DE CONTENIDO

	Páginas
CERTIFICACIÓN	iii
DECLARACION DE RESPONSABILIDAD	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTO	vi
TABLA DE CONTENIDO	vii
ÍNDICE DE TABLAS	xii
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
ÍNDICE DE GRÁFICOS	xiv
ÍNDICE DE ANEXOS	xv
RESUMEN	xvii
SUMARY	xviii
INTRODUCCIÓN	- 1 -
 CAPÍTULO I	
1. MARCO TEORICO REFERENCIAL	- 8 -
1.1 Antecedentes de la Investigación	- 8 -
1.2 Bases Teóricas	- 9 -
1.2.1 Agua	- 9 -
1.2.1.1 Propiedades	- 10 -
1.2.1.2 Importancia	- 10 -
1.2.1.3 Disponibilidad del agua	- 11 -
1.2.2 Métodos de purificación del agua	- 13 -
1.2.2.1 Método de Ozonización	- 13 -

1.2.2.2	<i>Osmosis Inversa (OI)</i>	- 13 -
1.2.2.3	<i>Luz Ultravioleta (UV)</i>	- 14 -
1.2.2.4	<i>Cloración</i>	- 15 -
1.2.2.5	<i>Aeración</i>	- 15 -
1.2.2.6	<i>Adsorción sobre carbón activado</i>	- 16 -
1.2.3	<i>Dureza del Agua</i>	- 16 -
1.2.3.1	<i>Clasificación de aguas según grado de dureza</i>	- 17 -
1.2.3.2	<i>Impactos del agua dura</i>	- 17 -
1.2.3.3	<i>Impactos del agua blanda</i>	- 18 -
1.2.4	<i>Medios bacteriológicos</i>	- 18 -
1.2.4.1	<i>Tipos de Medios</i>	- 18 -
1.2.4.2	<i>Preparación de los medios</i>	- 20 -
1.2.5	<i>Peligros microbianos relacionados con el agua de consumo</i>	- 21 -
1.2.5.1	<i>Infecciones transmitidas por el agua</i>	- 21 -
1.2.5.2	<i>Peligros de tipo químico en el agua de consumo</i>	- 24 -
1.2.5.3	<i>Aspectos relativos a la aceptabilidad</i>	- 25 -
1.2.5.4	<i>Tratamiento a los problemas de sabor, olor y aspecto</i>	- 25 -
1.2.6	<i>Antimicrobianos</i>	- 25 -
1.2.6.1	<i>Clasificación</i>	- 26 -
1.2.7	<i>Grupos de antibióticos de importancia:</i>	- 27 -
1.2.7.1	<i>Betalactámicos</i>	- 27 -
1.2.7.2	<i>Glucopéptidos</i>	- 29 -
1.2.7.3	<i>Aminoglucósidos</i>	- 29 -

1.2.7.4	<i>Macrólidos</i>	- 29 -
1.2.7.5	<i>Quinolonas</i>	- 30 -
1.2.8	<i>Resistencia a antibióticos</i>	- 30 -
1.2.8.1	<i>Tipos de resistencia</i>	- 31 -
1.2.8.2	<i>Resistencia en el ambiente</i>	- 32 -
1.2.8.3	<i>Fuentes de los antibióticos en el ambiente</i>	- 33 -
1.2.9	<i>Resistomas</i>	- 34 -
1.2.10	<i>Aislamiento de bacterias resistentes a antibióticos del agua</i>	- 36 -

CAPÍTULO II

2	MARCO METODOLÓGICO	- 38 -
2.1	Lugar de la investigación	- 38 -
2.2	Unidad de análisis	- 38 -
2.3	Población de estudio	- 38 -
2.4	Tamaño de la muestra	- 39 -
2.5	Selección de la muestra	- 39 -
2.5.1	<i>Técnica de captación en grifos y transporte de muestras.</i>	- 40 -
2.5.2	<i>Registro de las muestras.</i>	- 41 -
2.6	Siembra de las muestras en los medios de cultivo	- 42 -
2.6.1	<i>Siembra en Agar Cetrimide</i>	- 42 -
2.6.2	<i>Siembra en placas con película secas rehidratables Petrifilm</i>	- 44 -
2.7	Cuantificación de las bacterias heterótrofas aerobias mesófilas	- 45 -

2.8	Aislamiento y purificación de las colonias de bacterias heterótrofas aerobias mesófilas.	- 46 -
2.8.1	<i>Preparación del Agar Nutritivo</i>	- 47 -
2.8.2	<i>Purificación de las colonias aisladas</i>	- 47 -
2.9	Caracterización macroscópica y microscópica de los aislados bacterianos encontrados.	- 48 -
2.9.1	<i>Caracterización macroscópica</i>	- 48 -
2.9.2	<i>Caracterización microscópica</i>	- 50 -
2.10	Identificar taxonómicamente los microorganismos aislados	- 52 -
2.10.1	<i>Prueba de la catalasa</i>	- 52 -
2.10.2	<i>Prueba de la oxidasa</i>	- 53 -
2.10.3	<i>Prueba de la coagulasa</i>	- 54 -
2.10.4	<i>Preparación del caldo cerebro-corazón</i>	- 55 -
2.10.5	<i>Preparación del Agar Mueller-Hinton</i>	- 56 -
2.10.6	<i>Prueba de la sensibilidad a la Novobiocina</i>	- 57 -
2.10.7	<i>Siembra en agar Manitol Salado</i>	- 58 -
2.10.8	<i>Pruebas con agar Kligler</i>	- 59 -
2.10.9	<i>Prueba del Citrato</i>	- 61 -
2.10.10	<i>Prueba de la Urea</i>	- 63 -
2.10.11	<i>Siembra en agar semisólido SIM</i>	- 64 -
2.11	Determinar los perfiles de resistencia antimicrobiana de las bacterias identificadas.	- 67 -
2.11.1	<i>Preparación de la escala McFarland</i>	- 67 -
2.11.2	<i>Antibiograma</i>	- 68 -

CAPÍTULO III

3	MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS..	- 71 -
3.1	Tomar la muestra de agua de consumo siguiendo protocolos que permitan un muestreo y transporte adecuado de acuerdo a la Norma NTE INEN 2176: 2013.....	- 71 -
3.2	Cuantificación las bacterias heterótrofas aerobias mesófilas presentes en las muestras del agua de consumo.....	- 71 -
3.3	Aislamiento y purificación de las colonias de bacterias heterótrofas aerobias mesófilas presentes en las muestras del agua de consumo.....	- 75 -
3.4	Caracterización macroscópica y microscópica de los aislados bacterianos encontrados.....	- 75 -
3.5	Identificación taxonómica de bacterias aisladas y purificadas de las muestras de agua potable y envasada.	- 77 -
3.6	Determinación de los perfiles de resistencia antimicrobiana de las bacterias aisladas e identificadas de muestras de agua potable y envasada de la ciudad de Riobamba.	- 81 -
	CONCLUSIONES.....	- 89 -
	RECOMENDACIONES.....	- 92 -
	BIBLIOGRAFÍA	
	ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1: Clasificación de aguas según el grado de dureza.....	- 17 -
Tabla 2-2: Agentes patógenos importantes en el agua y en sistemas de abastecimiento de agua.....	- 22 -
Tabla 3-2: Redes de distribución de la ciudad de Riobamba.....	- 38 -
Tabla 4-2: Sitios de recolección de las muestras de agua de grifo.....	- 39 -
Tabla 5-2: Recolección de muestras de agua mineral natural embotellada.	- 39 -
Tabla 6-2: Codificación y registro de las muestras.....	- 42 -
Tabla 7-2: Coloración de Gram	- 51 -
Tabla 8-2: Proporciones de los constituyentes para la escala McFarland.....	- 68 -
Tabla 9-3: Cuantificación de las bacterias heterótrofas aerobias mesófilas en muestras de agua potable y envasada de la ciudad de Riobamba.....	- 72 -
Tabla 10-3: Caracterización macroscópica y diferenciación por la tinción GRAM de colonias bacterianas aisladas y purificadas en muestras de agua potable y agua envasada de la ciudad de Riobamba.....	- 76 -
Tabla 11-3: Pruebas de Catalasa y Oxidasa de las colonias bacterianas aisladas de muestras de agua potable y envasada de la ciudad de Riobamba.	- 77 -
Tabla 12-3: Pruebas realizadas a las colonias aisladas y purificadas de Cocos GRAM Positivos obtenidos de las muestras de agua potable y envasada.	- 78 -
Tabla 13-3: Pruebas realizadas a las colonias aisladas y purificadas de Bacilos GRAM Negativos obtenidos de las muestras de agua potable y envasada.....	- 79 -
Tabla 14-3: Antibiograma de las bacterias identificadas del grupo de Bacilos Gram Negativos obtenidos de muestras de agua potable y envasada.	- 82 -
Tabla 15-3: Antibiograma de las bacterias identificadas del grupo de los Cocos Gram Positivos aislados de muestras de agua potable y envasada de la ciudad de Riobamba.....	- 84 -

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1: Distribución mundial del agua	- 12 -
Figura 2-2: Ejemplos de agentes patógenos y vías de transmisión relacionados con el agua.....	- 23 -
Figura 3-1: Sitios de acción de los antimicrobianos	- 27 -
Figura 4-1: Estructura química de los betalactámicos	- 28 -
Figura 5-1: Clasificación de los betalactámicos	- 28 -
Figura 6-1: Clasificación de los Glicopéptidos.....	- 29 -
Figura 7-1: Clasificación de los Macrólidos y Aminoglicosidos.....	- 30 -
Figura 8-2: Técnica de siembra en placa por extensión.....	- 44 -
Figura 9-2: Técnica de siembra en estrías	- 46 -
Figura 10-2: Morfología de las colonias.....	- 49 -

ÍNDICE DE GRÁFICOS

- Gráfico 1-3:** Porcentaje de crecimiento bacteriano en las muestras de agua potable y agua envasada obtenida en la ciudad de Riobamba..... - 73 -
- Gráfico 2-3:** Porcentaje de tipos de bacterias según la tinción GRAM aislados de muestras de agua potable y envasada de la ciudad de Riobamba. - 77 -
- Gráfico 3-3:** Porcentaje de bacterias identificadas de Cocos Gram positivos..... - 79 -
- Gráfico 4-3:** Porcentaje de bacterias cocos Gram positivos identificados de las muestras de agua potable y envasada de la ciudad de Riobamba. - 80 -
- Gráfico 5-3:** Porcentaje de Resistencia y Sensibilidad a los antibióticos en Bacilos Gram negativos aislados de muestras de agua potable y envasada de la ciudad de Riobamba..... - 83 -
- Gráfico 6-3:** Porcentaje de Resistencia y Sensibilidad a los antibióticos en bacterias Cocos Gram Positivos aislados de muestras de agua potable y envasada de la ciudad de Riobamba..... - 85 -

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A: Crecimiento microbiológico en las Placas de Petrifilm

Anexo B: Aislamiento de las bacterias en cajas Petri con Agar Nutritivo.

Anexo C: Prueba de la Catalasa

Anexo D: Prueba de la Oxidasa

Anexo E: Repique de las colonias Cocos Gram Positivos

Anexo F: Siembra en Manitol Salado de las muestras de Cocos Gram Positivos.

Anexo G: Prueba de Coagulasa en las muestras de Cocos Gram Positivos

Anexo H: Prueba de la Sensibilidad a la Novobiocina (5µg).en muestras de Cocos Gram Positivos

Anexo I: Pruebas bioquímicas realizadas a las cepas de Bacilos Gram Negativos

Anexo J: Estandarización de la carga bacteriana con el McFarland

Anexo K: Realización del antibiograma

Anexo L: Crecimiento e inhibición de disco de Meticilina

Anexo M: Filtro utilizado para filtrar la Urea

Anexo N: Tiras de Oxidasa

Anexo O: Medios de Cultivo utilizados

RESUMEN

El objetivo del trabajo de investigación fue estudiar los perfiles de susceptibilidad antimicrobiana de las bacterias aisladas del agua de consumo en la ciudad de Riobamba, provincia de Chimborazo. Las muestras de agua fueron tomadas de seis (grifos) casas de diferentes redes de distribución y de cinco botellas de agua de fuentes naturales y/o minerales. Se utilizó pruebas bioquímicas clásicas, el método de Kirby Bauer y la susceptibilidad antibiótica, se estudió por difusión en placas y con las tablas según la NCCLS (Nacional Committe for Clinical Laboratory Standards), se verificó los límites de los diámetros de las zonas de inhibición para sepas patrón. Sobre las 11 muestras de agua estudiadas, se obtuvieron 26 aislamientos de las cuales se identificaron 13 cepas puras, de estas, 7 colonias de Bacilos Gram negativos se identificaron a *Pseudomona spp.* (42,86%), *Burkholderia cepacia* y *Ralstonia pickettii* (14,29%) y *Brevundimona diminuta* 28,57%, y se observó un 100% de resistencia a Ampicilina 10µg, 5 de ellas resistentes a Gentamicina 10µg y Estreptomicina 300µg (71,43%), 1 resistente a Minociclina 30µg y Meropenem 10µg (14,29%), a Ciprofloxacina 5µg y Trimetroprim-Sulfametazol 25µg tienen una sensibilidad del 100%; mientras que las 6 colonias de Cocos Gram positivos se identificaron a *Staphylococcus spp.* (66,67%), *Enterococcus* y *Micrococcus* (16,67%), observándose un 100% de resistencia a Meticilina 5µg, 6 de ellas resistentes a Ampicilina 10µg y Gentamicina 10µg (85,71%), 3 resistentes a Trimetroprim-Sulfametoxazol 25µg (42,86%) y 2 resistentes a Meropenem 10µg (28,57%), a Minociclina 30µg, Ciprofloxacina 5µg y Estreptomicina 300µg poseen una sensibilidad del 100%. Se concluye que las bacterias del agua de consumo en la ciudad de Riobamba pueden contribuir al problema global de la diseminación de la resistencia antibiótica, por lo que se recomienda la necesidad de extender la red de vigilancia a contaminantes del agua y el suelo.

Palabras Claves: <AGUA POTABLE> <RIOBAMBA [CANTÓN]> <MICROBIOLOGIA> <SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA>, <ANTIBIÓTICOS>, <AISLAMIENTO>, <CEPAS PURAS> <MÉTODO DE DIFUSIÓN EN PLACA>

SUMMARY

The objective of the investigation work was studying the microbial susceptibility profiles of the isolated bacteria of drinking water in Riobamba city, Chimborazo province. The water samples were taken from six (water taps) houses of different distribution networks and from five water bottles from natural or mineral fountains. Classic biochemical tests were conducted as well as the Kirby Bauer and the antibiogram susceptibility. It was studied through plate diffusion and with the tables according to NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards); the diameter limits of the inhibition zones for the pattern strains were verified. Of the 11 studied water samples 26 isolations were obtained from which 13 pure strains were identified, of these 7 colonies of gram negative bacilli were identified to *Pseudomonas spp.* (42,86%), *Burkholderia cepacia* y *Ralstonia pickettii* (14,29%) y *Brevundimonas diminuta* (28,57%); 100% resistance to 10µg Ampiciline, was observed, 5 of them resistant to 10µg Gentamicine and 300µg Streptomycine (71,43%), 1 resistant to 30µg Minocycline and 10µg Meropenem (14,29%), to 5µg Ciprofloxacin and 25µg Trimethoprim-Sulfamethoxazole have a 100% sensibility; while the 6 colonies of gram positive cocci were identified to *Staphylococcus spp.* (66,67%), *Enterococcus* and *Micrococcus* (16,67%), observing 100% resistance to 5µg Meticilina, 6 of them resistant to 10µg Ampiciline and 10µg Gentamicine (85,71%), 3 resistant to 25µg Trimethoprim-Sulfamethoxazole (42,86%) and 2 resistant to 10µg Meropenem (28,57%), to 30µg Minocycline, 5µg Ciprofloxacin and 300µg Streptomycine possessing 100% sensibility. It is concluded that the drinking water bacteria in Riobamba city can contribute to the global problem of dissemination of the antibiotic resistance; this is why the need to extend the surveillance network to water and soil contaminants is recommended.

Key Words: <DRINKING WATER> <RIOBAMBA [CANTÓN]> <MICROBIOLOGY> <ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY>, <ANTIBIÓTICS>, <ISOLATION>, <PURE STRAINS> < PLATE DIFFUSION METHOD>

INTRODUCCIÓN

SITUACIÓN PROBLEMÁTICA

Uno de los principales problemas de salud pública en la actualidad es la resistencia a los antimicrobianos, debido al surgimiento de una creciente población de microorganismos resistentes y multiresistentes a diversos antibióticos, lo que representa una amenaza grave que día a día implica nuevas especies de microorganismos, al igual que nuevos mecanismos de resistencia, por lo que surge un problema muy relevante para el tratamiento de enfermedades infecciosas ya que podrían los antibióticos disponibles, no ser efectivos. (LÖSCH, et al., 2006, <http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/cyt2006/03-Medicas/2006-M-022.pdf>)

Se observa que en países donde existe una enorme prescripción ya sea por parte del personal de salud, o por el uso indiscriminado por parte de la población en general, además del uso no controlado de estos compuestos en medicina veterinaria, hay un mayor incremento de la población de bacterias resistentes.

La comunidad científica se preocupa de este problema debido a los resultados para la salud humana, que sigue preocupando cada vez más debido a la contaminación de las aguas superficiales y profundas con microorganismos resistentes, como también con residuos de antimicrobianos o sus metabolitos, lo cual se traduce en una presión selectiva para favorecer la población de microorganismos multiresistentes. (LÖSCH, et al., 2006, <http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/cyt2006/03-Medicas/2006-M-022.pdf>)

En los ambientes acuáticos, la actividad bacteriana se encuentra íntimamente relacionada con la transferencia de material genético, la que a su vez depende de los siguientes factores: temperatura, presencia de compuestos que ejerzan presión antibiótica selectiva disponibilidad de nutrientes, densidad bacteriana y bacterias que actúen como donantes y receptoras. (SÉVENO & KALLIFIDAS, 2002, pp. 15-27).

Los sedimentos y las rocas sumergidas, plantas de tratamiento de agua y plantas de tratamientos de efluentes, proveen superficies fáciles de colonizar donde la transferencia de material genético y la actividad bacteriana se encuentran beneficiadas. Esta situación ha dado origen que a los ecosistemas donde se pueden encontrar genes de resistencia a los antimicrobianos se les

denomine Resistomas. (LöSCH, et al., 2006, <http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/cyt2006/03-Medicas/2006-M-022.pdf>)

Como Oficina Regional de la OMS para las Américas, actúa la Organización Panamericana de la Salud (OPS), que es el encargado desde 1996 de coordinar la recolección de datos de 21 países de la Región que conforman la Red Latinoamericana de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos acerca de los antibióticos resistentes en laboratorios y hospitales.

Según los datos del informe, en las Américas existe una resistencia elevada de fluoroquinolonas y cefalosporinas de tercera generación *en E. coli* a, dos clases de fármacos antibacterianos muy utilizadas y de gran importancia. Esta bacteria puede causar infecciones intestinales y extraintestinales, por lo general graves, como infecciones de las vías urinarias, aparato excretor, peritonitis, septicemia, cistitis, meningitis, mastitis, y neumonía. (OMS, 2014, <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/es/>).

Por otra parte, la resistencia a cefalosporinas de tercera generación también es elevada y generalizada frente a *Klebsiella pneumoniae*, esta es causante de neumonías, sepsis, infecciones del tracto urinario, infecciones de tejidos blancos y de heridas quirúrgicas. (EFE, 2014, http://ecuador.servidornoticias.com/24_salud/2518829_la-oms-advierte-sobre-la-creciente-resistencia-a-los-antibioticos.html).

De igual forma, en algunos entornos, en las infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* existe resistencia a meticilina hasta un 80%, esto hace suponer que no funcionaría el tratamiento con los antibióticos frecuentes. Esta bacteria puede causar una gran variedad de enfermedades a partir de infecciones de mucosas o cutáneas, relativamente benignas, hasta otras como sepsis, osteomielitis, meningitis, celulitis, abscesos profundos, neumonía o endocarditis. (OMS, 2014, <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/es/>).

La asesora regional de la OPS, de Gestión Clínica de Enfermedades Infecciosas y Vigilancia de Resistencia Antimicrobiana, Pilar Ramón Pardo, ha señalado que “los antibióticos lo toman más de la mitad de pacientes medicados”. Deben sumarse al esfuerzo mundial los países de América, en el que consta Ecuador, para enfrentar esta amenaza para la salud pública, ya que es muy vulnerable a la progresiva resistencia de los antibióticos. (EFE, 2014, http://ecuador.servidornoticias.com/24_salud/2518829_la-oms-advierte-sobre-la-creciente-resistencia-a-los-antibioticos.html).

FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

La resistencia bacteriana a los antibióticos (RBA) ocurre en cualquier situación tanto en países de bajos, medianos y altos ingresos, puede afectar a cualquier persona de cualquier edad, así como también en el ambiente hospitalario como comunitario, siendo un problema de salud mundial real que acarrea fuertes impactos en costos, morbilidad y mortalidad. Y como menciona Ramón Pardo “Frecuentemente los antibióticos se usan en exceso y se expenden de forma inapropiada en los países de América”. (OMS, 2014, <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/es/>).

El uso de antibióticos debería ser el último recurso, existe dos puntos importantes que señalar, uno es que se utiliza los antibióticos de manera frívola. Se utiliza para enfermedades que no son bacterianas en lo absoluto, con los animales domésticos y las plantas, para rociar los árboles de manzana y controlar las enfermedades bacterianas. Esto supone la posibilidad de un desastre sanitario inminente.

Al tomar, por ejemplo, el uso de antibióticos en la acuicultura, donde se crían camarones, ostras o pescado, una cosa es alimentar a un pez determinado con antibióticos para promover su crecimiento, y otra completamente distinta es arrojar imprudentemente antibióticos en el mar. El uso adecuado de los antibióticos es esencial. El otro punto es de orden social. Será uno de los mayores obstáculos para la medicina y el control de enfermedades, en los próximos 20 años. Así que cada uno tiene una responsabilidad al respecto. (QUIZHPE, 2014, <http://www.reactgroup.org/uploads/react/resources/854/Uso-Apropiado-de-Antibioticos-y-Resistencia-Bacteriana.pdf>)

La OMS trabaja a nivel local, nacional e internacional para generar la capacidad, las orientaciones técnicas y el compromiso político necesarios para hacer frente a la amenaza que supone la resistencia a los antibióticos. (OMS, 2014, <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/es/>)

Desde 1999, en Ecuador existe la organización encargada de presentar datos sobre resistencia bacteriana tanto a nivel hospitalario como comunitario, llamada Red Nacional de Resistencia Bacteriana de Ecuador (REDNARBEC), los últimos datos que reportan en el 2008, indica la resistencia a nivel comunitario de tetraciclina un 96% y a ampicilina 93% en *Shigella spp.*, un 30% a tetraciclina en *Salmonella spp.*, 71% a ampicilina y tetraciclina en *Escherichia coli*, un 30% a eritromicina y oxacilina un 25% en *Staphylococcus aureus*”. (QUIZHPE, 2011, p. 15).

Al referirnos a las bacterias resistentes a antibióticos en medios acuáticos podemos mencionar que estas llegan a los ríos a través de las aguas residuales, los aspectos de interés es conocer la capacidad de estas bacterias para sobrevivir en condiciones naturales así como para intercambiar material genético en dichos ambientes. Debido a que las depuradoras presentan condiciones hostiles para la supervivencia de dichas bacterias por su temperatura ambiente, condiciones físico-químicas de los reactores y la gran abundancia de depredadores (organismos bacterívoros y virus). (BÉCARES, et al., 2011, pp. 32-43).

En general, las depuradoras reducen en 1-3 logaritmos la abundancia de bacterias del agua de entrada (HIRATA, et al., 2003, p. 5). Sin embargo, esta reducción en la abundancia de bacterias no va acompañada de una reducción de bacterias resistentes, sino al contrario.

Las depuradoras convencionales de tratamiento de aguas residuales (fangos activados) tienden a aumentar el porcentaje de bacterias resistentes en su efluente como consecuencia de la gran abundancia de bacterias en el reactor biológico y del tiempo de contacto entre ellas, lo que incrementa las tasas de intercambio genético (conjugación, transformación y transducción), y por tanto, el porcentaje de bacterias resistentes a antibióticos. (BÉCARES, et al., 2011, p. 5)

La causa de la resistencia a antibióticos es natural, es decir, las propias bacterias han desarrollado mecanismos para inactivar las sustancias antibióticas producidas como elemento de defensa o estrategia competitiva con otros microorganismos (MARTÍNEZ, 2009, p. 4). Pero esta resistencia, o estrategia adaptativa de las bacterias, está potenciada por la actividad humana con el uso de antibióticos para el tratamiento de enfermedades humanas y animales.

En este caso, el mecanismo selectivo impuesto por el hombre al aumentar la probabilidad de contacto de los antibióticos con las bacterias ha provocado una rápida selección de las poblaciones bacterianas, favoreciendo aquellas resistentes (ALONSO, et al., 2001, p. 4). Aunque la resistencia a antibióticos puede aparecer en ausencia de antibiótico por mutación genética (HENRIQUES, et al., 2006, p. 4), ha sido el uso excesivo de antibióticos lo que ha provocado un incremento alarmante de resistencias que incluso ha llevado a adoptar medidas legales restringiendo su libre adquisición (KÜMMERER, 2004, p. 5).

Para acabar con este problema de salud existe un gran desafío del compromiso progresivo de autoridades, profesionales, académicos y la comunidad de crear un ambiente de conciencia y alerta, ya que las acciones planificadas y ejecutadas a corto o largo plazo deben ser sostenibles y participativas que ayuden al esfuerzo local, regional y nacional de manera exitosa y efectiva para la vida de las personas. (QUIZHPE, 2011, p. 15).

JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

El uso inapropiado de los antibióticos en medicina humana y animal, en la agricultura y productos para el hogar, en prescripciones erradas para infecciones no bacterianas, adición y uso de antibióticos como estimulante del crecimiento de animales domésticos o incluso en los productos de limpieza, han ayudado a crear un reservorio de bacterias resistentes a los antibióticos o Resistomas en diversos ecosistemas urbanos y rurales.

Lamentablemente, es tiempo de enfrentarse a una realidad que amenaza con eliminar los avances de la medicina moderna: La RBA aumenta el riesgo de muerte y prolonga la duración de la enfermedad, cuando las infecciones por bacterias resistentes no responden a los tratamientos habituales. Pone en peligro el control de las enfermedades infecciosas propiciando la propagación de los microorganismos resistentes a otras personas (amigos, vecinos, familiares) en un círculo vicioso.

Podría arrastrar a la humanidad a la época anterior al descubrimiento de los antibióticos (era pre-antibiótica), haciendo que muchas enfermedades infecciosas actualmente controlables y fácilmente curables se vuelvan intratables, como la gonorrea, la neumonía, amigdalitis e infecciones de las vías urinarias, entre otras.

De igual forma, encarece la asistencia médica, pues las infecciones dejan de responder a los antibióticos de primera línea, siendo necesario recurrir a productos más caros e incluso a algunos que aún no están disponibles en nuestro país. Por lo tanto incrementa los costos en los centros de salud y se ven notoriamente afectados los hogares por la gran carga económica al igual que en la sociedad además pone en riesgo los logros de la asistencia sanitaria, ya que los antibióticos son herramientas terapéuticas altamente útiles en los trasplantes de órganos, cirugías de alto riesgo, y como coadyuvante en el tratamiento de diversos tipos de cáncer. (QUIZHPE, 2014, p. 26)

La RBA hace peligrar los adelantos conseguidos. Al debilitarse la seguridad sanitaria, el comercio y las economías, puede por ejemplo que el aumento del comercio y los viajes internacionales entre países permitan a las bacterias resistentes a propagarse rápidamente a países y continentes lejanos. (QUIZHPE, 2014, p. 26).

Como estrategia de represión a la resistencia antimicrobiana es fundamental la vigilancia, ya que permite: implementar medidas de control en el uso de antimicrobianos, detectar patrones de

cambio de sensibilidad a resistencia, evaluar el impacto de las intervenciones, prevenir la diseminación de cepas bacterianas resistentes y multiresistentes. (LÖSCH, et al., 2006, p. 2).

Los trabajos de vigilancia de la resistencia bacteriana se realizan la gran mayoría a partir de gérmenes aislados de muestras clínicas, no obstante, el estudio también se debe ampliar a bacterias recuperadas de muestras ambientales con el objeto de evaluar su posible papel como Resistomas, que significa reservorio de genes codificadores de resistencia y su capacidad para transferirlos horizontalmente a microorganismos patógenos humanos (ALONSO, et al., 2001, p. 5).

Debido a que los medios acuáticos constituyen las principales fuentes de agua para el consumo humano y animal, la polución de los mismos puede contribuir a mantener e incluso diseminar elementos de resistencia bacteriana. (GOÑI-URRIZA, et al., 2006, p. 130).

Por ejemplo las *Pseudomonas* presentan una distribución cosmopolita, aislándose de agua, tierra, animales, plantas, y seres humanos. Al ser muy tolerante a una variedad de condiciones físicas se considera como un patógeno oportunista eficaz. Es el patógeno responsable de infecciones nosocomiales y comunitarias, reconocido completamente y resulta un problema a la hora de elegir el antimicrobiano más adecuado, debido a que posee una elevada resistencia intrínseca a múltiples antibióticos y a una capacidad extraordinaria para adquirir nuevos mecanismos de resistencia, principalmente por mutaciones. (POLLACK, 1997, p. 2220). El Código Alimentario Nacional lo considera como un indicador de la calidad microbiológica del agua destinada al consumo humano. (LÖSCH, et al., 2004, p. 2).

Mientras que la especie de la Familia *Enterobacteriaceae* son causantes de un gran número de cuadros infecciosos y pueden ser recuperados de cualquier muestra recibida en el laboratorio. (KONEMAN, et al., 1999, p. 222). En la naturaleza se encuentran ampliamente distribuidas, principalmente en agua y suelos, también en el tracto intestinal de seres humanos y animales. (LÖSCH, et al., 2006) Esta última situación ha llevado a que especies de esta familia sean evaluadas como indicadores de contaminación en aquellas aguas destinadas al consumo humano, conformando lo que se llamó grupo de los coliformes totales.

OBJETIVOS

Objetivo General

Estudiar la susceptibilidad antimicrobiana en bacterias aisladas del agua de consumo en la ciudad de Riobamba, provincia de Chimborazo.

Objetivos Específicos

- 1 Tomar la muestra de agua de consumo siguiendo protocolos que permitan un muestreo y transporte adecuado de acuerdo a la Norma NTE INEN 2176: 2013.
- 2 Cuantificar las bacterias heterótrofas aerobias mesófilas presentes en las muestras del agua de consumo.
- 3 Aislar y purificar las colonias de bacterias heterótrofas aerobias mesófilas presentes en las muestras del agua de consumo.
- 4 Caracterizar de forma macroscópica y microscópica los aislados bacterianos encontrados.
- 5 Identificar taxonómicamente los microorganismos aislados.
- 6 Determinar los perfiles de resistencia antimicrobiana de las bacterias identificadas mediante el método de Kirby-Bauer.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEORICO REFERENCIAL

1.1 Antecedentes de la Investigación

En la publicación de Losch, Liliana, Merino Luis y Alonso José sobre “Resistencia antimicrobiana en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de fuentes de agua de la provincia del Chaco (Argentina)” realizado en el Instituto de Medicina Regional-Universidad Nacional del Nordeste menciona que fueron aisladas de fuentes superficiales, subterráneas y de red un total de 47 cepas de *Pseudomonas aeruginosa*; 10 (21.3%) fueron resistentes a la gentamicina; 7 aisladas de fuentes superficiales y la única cepa resistente a imipenem al enfrentar a meropenem demostró ser resistente a este antibiótico, sin afectar la sensibilidad a otros betalactámicos. y 3 de fuentes subterráneas.

Concluyendo que el porcentaje de resistencia en cepas ambientales de *Pseudomonas aeruginosa* fue mayor a lo esperado para cepas nativas y puede ser interpretado como un indicador de las consecuencias ambientales del uso irracional de antibióticos en prácticas médicas y veterinarias y de la contaminación de las fuentes de agua con estos compuestos” (LÖSCH, et al., 2004, p. 3).

En la investigación realizada en el Instituto de Medicina Regional - Universidad Nacional del Nordeste por Losch, Liliana, Merino Luis y Alonso José sobre “Estudio del perfil de sensibilidad antibiótica de especies de la Familia Enterobacteriaceae de fuentes de agua de la provincia del Chaco”, resaltando que “de 68 aislamientos de este microorganismo un 44,1% fue resistencia a ampicilina, 4 resistentes a ampicilina-sulbactama (13,3%), un 27,9% resistente a cefalotina, 4,4% al ácido nalidíxico y a cloranfenicol, la resistencia a trimetoprima-sulfametoxazol fue del 5,9%, concluyendo que el porcentaje de resistencia en cepas ambientales de la Familia Enterobacteriaceae fue mayor a la esperada para cepas nativas.

Estos hallazgos sugieren que las bacterias de estos ambientes acuáticos pueden contribuir al emergente problema de la diseminación de la resistencia antibiótica. Los antimicrobianos nos enfrentan a efectos irreversibles en el medioambiente y que se ejercen incluso a muy bajas concentraciones, situación que no lo presentan otros compuestos químicos. Además sólo el 5 al 10% de los microorganismos en los ambientes acuáticos son cultivables, por lo que el estudio de

su resistencia nos permite evaluar sólo una pequeña fracción del impacto de los antibióticos en el ecosistema acuático”. (LÖSCH, et al., 2006, p. 2)

En otro estudio, en este caso realizado por Liliana LÖSCH y Luis Antonio MERINO sobre Susceptibilidad antimicrobiana de aislamientos de *Escherichia coli* provenientes de diversas fuentes de agua del Chaco (Argentina) realizado en el Instituto de Medicina Regional - Universidad Nacional del Nordeste en el área de Bacteriología donde resalta que “de un total de 525 muestras estudiadas recuperaron 114 aislamientos de *Escherichia coli*, 49 provenían de fuentes subterráneas, 44 superficiales y 21 de red. De las 114 cepas estudiadas, 36 (31,5%) evidenciaron resistencia hacia compuestos betalactámicos y 2 (1,8%) a quinolonas.

En 4 aislamientos (3,5%) se observó resistencia solamente a ampicilina, de las cuales 2 provenían de fuentes subterráneas, 1 de red y la restante de fuente superficial; 6 aislamientos de *Escherichia coli* (5,3%), fueron resistentes a ampicilina y cefalotina, 4 de ellas provenían de fuentes subterráneas y 2 de superficiales. En 2 aislamientos (1,8%) se observó resistencia combinada hacia ampicilina, ampicilina-sulbactama y cefalotina. Al realizar en estas 2 cepas el ensayo para detectar la presencia de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) ambas resultaron negativas.

Finalmente, en 24 aislamientos, (21%), se observó sensibilidad disminuida hacia cefalotina: 10 muestras procedían de fuentes subterráneas, 6 de red y 8 de fuentes superficiales. En 2 cepas (1,8%), una de fuente superficial y la otra subterránea, se observó resistencia hacia el ácido nalidíxico. Al enfrentar estas cepas a ciprofloxacina se comprobó que la de origen superficial fue sensible mientras que el aislamiento de origen subterráneo también era resistente hacia esta quinolona, arrojando negativa la prueba de bomba de expulsión”. (LÖSCH & MERINO, 2012, p. 4).

1.2 Bases Teóricas

1.2.1 Agua

Es una sustancia de vital importancia para los seres vivos, presenta propiedades incomparables debido a su estructura y composición. Constituida por un átomo de oxígeno y dos de hidrógeno que forman una molécula sencilla, establecen enlaces polares entre moléculas adyacentes que forman puentes de hidrógeno. (CARBAJAL & GONZÁLEZ, 2012, p. 63)

1.2.1.1 Propiedades

La formación de dichos enlaces le confiere propiedades como:

- Elevados puntos de ebullición y fusión, permitiendo al agua permanecer en estado líquido a temperatura ambiente.
- Alto calor de vaporización por ejemplo permite resguardarnos de los «golpes de calor» ya que nuestro cuerpo elimina grandes cantidades de calor mediante el sudor.
- Amplia capacidad como disolvente de sustancias polares
- Alto calor específico le otorga la capacidad amortiguadora y regulador de cambios térmicos, por lo que mantiene la temperatura corporal constante.
- Además de tener en cuenta que estamos mayoritariamente formados por agua, la mayor parte de las reacciones químicas de nuestro cuerpo se efectúan en un medio acuoso, al igual que la excreción de sustancias de desecho y el transporte de nutrientes y metabolitos. (CARBAJAL & GONZÁLEZ, 2012, pp. 63-64).

1.2.1.2 Importancia

Los seres vivos tienen la necesidad de agua para realizar sus funciones vitales, el hombre la necesita para cocinar y preparar los alimentos, usos domésticos, la higiene, para regar los campos, las centrales de energía, la industria, etc. El agua es un bien preciado e indispensable para todas las actividades humanas. (CARBAJAL & GONZÁLEZ, 2012, p. 65)

El proceso de la vida se da gracias al agua que posee el organismo, realmente por su capacidad para mantener el volumen celular y la homeostasia depende la supervivencia de las células. A pesar de depender del agua y ser el componente más abundante en el cuerpo, nuestro organismo no posee la capacidad de sintetizarla en cantidades suficientes ni almacenarla, por lo cual necesariamente debe ingerirse con mucha regularidad.

El agua debe formar parte de la dieta y considerarse un alimento o un verdadero nutriente ya que se debe ingerir en cantidades mucho mayores que cualquier otro nutriente, se considera que la ingesta mínima diaria en condiciones normales de temperatura, para la correcta salud humana es de 2 litros de agua, además siempre va a contener mínimas cantidades de otras sustancias disueltas las que aportan cualidades organolépticas y nutritivas tanto el agua que bebemos como el agua que se encuentra en los ríos, subterránea o de lluvia, la misma que en la naturaleza nunca se encuentra pura, incolora, insípida e inodora. (CARBAJAL & GONZÁLEZ, 2012, p. 251)

Ningún organismo es capaz de vivir sin agua, solo algunas especies pueden vivir sin oxígeno, incluso sin luz. El agua es tan esencial que una persona puede permanecer viva sin beber agua únicamente en un promedio máximo de 3 a 5 días, en condiciones de reposo absoluto, reduciendo un día si se encuentra en condiciones de alta temperatura (zonas desérticas), mientras que sin alimento puede vivir como máximo 60 días y con pocos sorbos de agua. Como menciona Hildreth Brian «*Un hombre puede vivir días sin comer, pero sólo unos 2-5 días sin agua*». (Brian, 1962), pudiéndose decir que es la base de la vida. “No hay vida sin agua”.

Podemos seguir vivos a pesar de perder la mitad proteína y casi toda grasa, pero perder sólo el 1-2% del agua corporal afecta a gran parte de nuestras funciones como la termorregulación, a los sistemas respiratorio y cardiovascular, además limita la capacidad mental y física; la pérdida de agua mayor puede tener consecuencias fatales. De hecho el feto crece en un ambiente extraordinariamente bien hidratado, y como mencionó Paracelso (1493-1541) “*el origen del mundo y de todas sus criatura proviene del agua*”. (CARBAJALI & GONZÁLEZ, 2003, p. 65).

1.2.1.3 Disponibilidad del agua

En las últimas décadas, ha crecido significativamente la producción de energía, alimentos y el servicio de agua potable a la población. Otro importante problema es su contaminación, ya que si pierde la calidad adecuada no sería posible su utilización agravando el problema de la escasez. Como por ejemplo, las descargas de aguas municipales e industriales si no tienen previo tratamiento contaminan las aguas subterráneas y superficiales, así como por los arrastres provenientes de las zonas donde practican actividades pecuarias y agrícolas. (SEMARNAT, 2012, http://app1.semarnat.gob.mx/dgeia/informe_12/06_agua/cap6_1.html).

Se estima que existe aproximadamente 1 400 millones de Km³ de agua en el planeta, de este valor sólo 2.5% es agua dulce. Localizándose especialmente en ríos, glaciares, mantos de hielo, lagos y acuíferos del mundo. Y alrededor del 97% son prácticamente inaccesibles para su uso, al encontrarse en el Ártico, Groenlandia y Antártica, los mantos de hielo y glaciares forman sólo las 3/4 partes del agua dulce (ver Figura 1-1). Sin embargo, para muchos países, la nieve y el hielo perennes de nevados, volcanes y cadenas montañosas incluso los glaciares continentales constituyen una fuente importante de recursos. (SEMARNAT, 2012, http://app1.semarnat.gob.mx/dgeia/informe_12/06_agua/cap6_1.html).

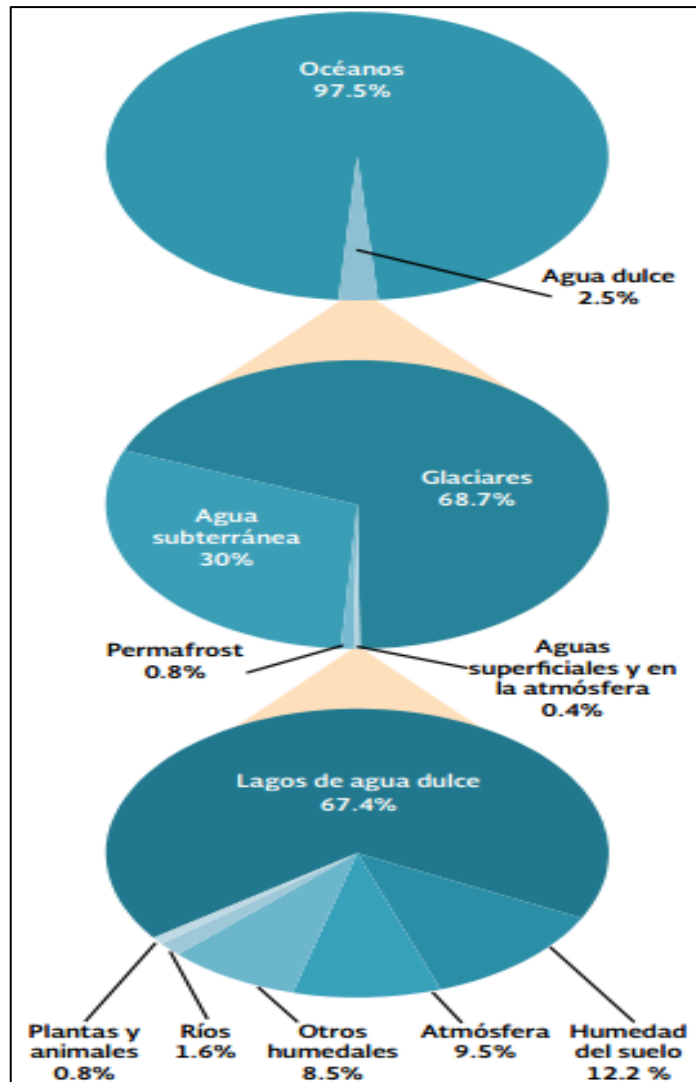


Figura 1-1: Distribución mundial del agua
Fuente: (PNUMA, 2007)

De la pequeña cantidad de agua dulce, sólo el 0.4 representa a aguas superficiales y en la atmósfera, 30% al agua subterránea y 0.8% a Permafrost. Al tomar en cuenta el agua dulce no congelada (31.2% del volumen total), el 96% simboliza el agua subterránea, agua que sirve para satisfacer la demanda de muchas sociedades en el mundo y como abastecimiento para humedales, manantiales y arroyos.

Mientras que el 1% del agua dulce no congelada retienen las aguas superficiales (humedales, embalses, lagos, ríos y arroyos); los lagos del mundo son capaces de almacenar 40 veces más lo contenido en los arroyos y ríos (91.000 versus 2.120 km³) y cerca de 9 veces lo que se almacena en pantanos y humedales. El agua presente en la atmósfera, el cual cumple un papel importante en la regulación del clima, representa un volumen significativamente menor a la de los lagos. (SEMARNAT, 2012, http://app1.semarnat.gob.mx/dgeia/informe_12/06_agua/cap6_1.html).

1.2.2 Métodos de purificación del agua.

1.2.2.1 Método de Ozonización

El inicio del ciclo es el almacenamiento el cual puede ser en un tanque o una cisterna, aquí se trata con Hipoclorito de Sodio en concentración de 3 a 4 ppm, permaneciendo en contacto mínimo 2 horas; ésta cloración impide la formación de microorganismos. Y para detener los sólidos en suspensión o partículas más grandes con ayuda de bombas se utiliza filtros de arena y grava; después el agua pasa por un filtro de carbón activado que elimina los sabores y olores producidos por el cloro y la materia orgánica presente.

A continuación para retener cualquier partícula de carbón, pasa por unos cartuchos sintéticos con micro perforaciones llamados filtros pulidores y si en los anteriores procesos quedan bacterias el agua pasa por la Lámpara Ultravioleta para inhibir su capacidad de reproducción, quedando el agua totalmente pura. (GARCÍA, 2011, www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/.../04-CAPITULO-1.doc)

Finalmente el agua pasa a través de un tanque mezclador donde se inyecta O₃, con la propiedad bactericida, la cual ayuda a mantener el agua pura e impedir la formación de microorganismos contaminantes hasta su paso por un tanque pulmón. (GARCÍA, 2011, www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/.../04-CAPITULO-1.doc)

1.2.2.2 Osmosis Inversa (OI)

Fue inventada en 1959, es uno de los más importantes métodos de purificación. Consiste en el paso recíproco a través de una membrana semipermeable que separa líquidos de distinta densidad y remueve los compuestos orgánicos disueltos como las sales, forma parte del tipo de membranas de filtrado con flujo cruzado. (VILLEGAS, 2013, pp. 26-27).

Osmosis Inversa utiliza una membrana semipermeable que posee un área "microporosa" que remueve hasta el 99% de todos los iones, de los cuales los iones "polivalentes" son más fácilmente rechazados que los iones "monovalentes", rechaza el 85%-95% de sólidos inorgánicos, elimina el 99.9% de virus, bacterias y pirógenos, gran parte de los compuestos orgánicos y material coloidal > 1 micra y quita del 95%-99% de los sólidos disueltos totales (SDT), son rechazados los sólidos orgánicos con un peso molecular mayor a 300, pero los gases pueden atravesarla proporcionando un agua segura y pura. (VILLEGAS, 2013, pp. 26-27)

El proceso de la ósmosis inversa, es similar a la ósmosis natural en los seres vivos donde la transferencia de nutrientes en las células se da a través de las membranas que las recubren. Este proceso se da desde la solución más diluida que atraviesa la membrana "empujada" por la presión osmótica hacia la más concentrada, hasta igualar las concentraciones de ambas y el equilibrio se obtiene cuando se iguala la columna hidrostática a dicha presión osmótica. Por ejemplo al poner en contacto, agua salada y agua destilada, a través de una membrana, se producirá un equilibrio y resultarán moderadamente saladas. (VILLEGAS, 2013, pp. 26-27).

1.2.2.3 Luz Ultravioleta (UV)

Proceso físico que al desinfectar el agua no produce cambios en la composición química, el olor ni el sabor del agua, son eliminados sólo los organismos que pasan por el esterilizador. La seguridad del método está comprobada científicamente y establece una elección económica, eficaz, ecológica y segura si se compara con los otros métodos de desinfección del agua, por ejemplo la cloración. (INNOVAQUA, 2011, <http://www.innovaqua.com/productos/uv.html>).

La luz ultravioleta posee una radiación de mayor energía que la luz visible, forma parte de una franja del espectro electromagnético, la más germicida es aquella con una longitud de onda de 254 nanómetros, provocando una serie de daños en su molécula de ADN. El ADN presenta un máximo de absorción cuando se expone a esta energía, provocando una inactivación irreversible en el crecimiento de los gérmenes ya que afecta a la división celular y causan la muerte. Y pueden eliminar microorganismos que se encuentren en el agua, como virus, bacterias, algas, parásitos y hongos. (INNOVAQUA, 2011, <http://www.innovaqua.com/productos/uv.html>)

No utilizan desinfectantes químicos o antibióticos que generen inmunoresistencia, por lo tanto no muestran efectos secundarios peligrosos. Los microbios se esconden tras la coraza de los sólidos suspendidos o partículas lo que causa un problema ya que pueden pasar sin absorber directamente del UV a través de los esterilizadores. Al realizar una filtración de al menos 5 micras de tamaño esta coraza puede reducirse. (INNOVAQUA, 2011, <http://www.innovaqua.com/productos/uv.html>)

La producción real de UV puede verse afectada por el tiempo de vida de la lámpara, la calidad del agua y la transmisión real a pesar de estar encendida la lámpara y parezca que está funcionando. Y se puede comprobar de manera efectiva que el UV esté funcionando correctamente al obtener pruebas microbiológicas del agua de alimentación se recomienda que se realice de manera periódica para asegurar que es agua biológicamente segura. La desventaja

del UV es que sólo es efectivo si la UV está en contacto con el microorganismo y por la falta de residuos activados. (TESACUA, 2000)

1.2.2.4 Cloración

Se puede realizar mediante:

- Gránulos de hipoclorito cálcico.- Se mezcla al caudal principal una porción de agua previamente disuelta con estos gránulos.
- Solución de hipoclorito sódico.- Mediante una bomba dosificadora eléctrica de desplazamiento positivo o de un sistema de suministro por gravedad se dosifica.
- Gas cloro licuado.- Este se suministra comprimido en recipientes a presión. El gas del cilindro se extrae mediante un clorador, este se añade al agua en dosis controlando y midiendo el caudal de gas.
- Generadores de cloro in situ.

Cualquiera de estas formas de cloro se disuelve en el agua y forma ión hipoclorito (OCl^-) y ácido hipocloroso (HOCl). (OMS, 2006, p. 147).

1.2.2.5 Aeración

En estos procesos la transferencia de oxígeno puede darse a través de una simple cascada o por difusión de aire al agua, no necesita de equipos complejos y retiran los gases y compuestos volátiles pero puede necesitar una planta especializada que facilite una transferencia de masa alta de la fase líquida a la gaseosa. Puede retirar sustancias orgánicas volátiles (disolventes), algunos compuestos que generan sabores, olores y radón (OMS, 2006, http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3_es_7_fig.pdf?ua=1).

Los aeradores de escalones o cascada (ocasiona pérdida de carga de altura significativa) están creados para lograr una transferencia de oxígeno eficiente por lo que el agua fluye en una capa delgada. Otra opción es mediante un sistema de tuberías perforadas sumergidas difunden aire comprimido. Se utilizan para la oxidación y precipitación del manganeso y hierro. (OMS, 2006, http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3_es_7_fig.pdf?ua=1)-

La aeración de cascada es la técnica más común que proporciona el contacto necesario entre el aire y el agua, logrando el arrastre con aire, los procesos de aeración deben ser mucho más complejos, se produce cuando el agua se hace fluir en capas delgadas sobre medios de plástico, mientras se insufla a contracorriente, normalmente se las llama torres de relleno cuya altura y

diámetro está en función de la volatilidad y la concentración de los compuestos que se desea retirar y del caudal unitario. (OMS, 2006, p. 150)

1.2.2.6 Adsorción sobre carbón activado

Se origina cuando se calienta de manera controlada material carbonoso, generalmente carbón, turba, cáscaras de coco o madera. Produciendo un material poroso con una gran superficie específica (500 a 1500 m²/g) y una afinidad alta por los compuestos orgánicos. Puede reactivarse al quemar controladamente las sustancias orgánicas adheridas, cuando el carbón activado pierde la capacidad de adsorción. Se utiliza habitualmente en polvo (CAP) o granular (CAG). No obstante, los dos se utilizan normalmente una sola vez y se desecha. Existen diferentes tipos de carbón activado con afinidades diferentes para diferentes tipos de contaminantes. (OMS, 2006, p. 151)

Según la frecuencia de uso y la dosis que se requieran se elige entre el CAP y el CAG. El CAP se utiliza cuando la contaminación es estacional o intermitente y en dosis bajas. Se añade al agua en forma de pasta y su uso se restringe en instalaciones de tratamiento de aguas superficiales que cuentan con filtros, ya que se separa en tratamientos posteriores junto con los lodos generados en los mismos.

El CAG se usa para eliminar sabores y olores, es más eficiente en adsorbedores de lecho fijo que el CAP añadido al agua, la cantidad efectiva de carbón sería mucho menor que la del CAP ya que se utiliza por volumen de agua tratado para lograr la misma reducción de contaminantes. (OMS, 2006, p. 151)

1.2.3 Dureza del Agua

Se derivada de la existencia de calcio y magnesio, generalmente podemos apreciar su presencia por la precipitación de restos insolubles de jabón y para conseguir la limpieza deseada surge la necesidad de utilizar más jabón. (OMS, 2006, p. 186)

La aceptabilidad de la población por el grado de dureza del agua puede variar en gran medida de una comunidad a otra, debido a las condiciones locales. Los consumidores, notan probablemente los cambios de la dureza del agua, encontrándose el valor del umbral gustativo del ion calcio entre 100 y 300 mg/l, dependiendo del anión asociado, mientras que el ión magnesio es probablemente menor que el del calcio. Los consumidores en algunos casos toleran una dureza del agua mayor que 500 mg/l. (OMS, 2006, p. 186)

El agua con una dureza aproximadamente mayor que 200 mg/l, en función de la interacción de otros factores, como el pH y la alcalinidad, puede provocar la formación de incrustaciones en las instalaciones de tratamiento, el sistema de distribución, las tuberías y depósitos de los edificios. Y se producen debido a una descomposición térmica del bicarbonato de magnesio y calcio solubles en el agua por acción del calor, precipitan los carbonatos (CaCO_3) insolubles y se elimina el dióxido de carbono. (NEIRA, 2006, pp. 11-12)

Estas incrustaciones están formadas en mayor proporción por calcita y dragonita en menor proporción, la primera tiene mayor capacidad incrustante que la dragonita. Estas tienen similar composición química y son carbonatos de calcio. (NEIRA, 2006, pp. 11-12)

Otra consecuencia será la formación de precipitados de carbonato cálcico al calentar las aguas duras. Por otra parte, las aguas blandas son más corrosivas para las tuberías debido a que posee una dureza menor que 100 mg/l y pueden tener una capacidad de amortiguación del pH baja. No se propone ningún valor de referencia basado en efectos sobre la salud para la dureza del agua de consumo. (OMS, 2006, p. 187)

1.2.3.1 Clasificación de aguas según grado de dureza

A pesar de existir una serie de clasificaciones, la más utilizada es la de la Organización Mundial de la Salud (OMS) esquematizada a continuación. (NEIRA, 2006, p. 7)

Tabla 1-1: Clasificación de aguas según el grado de dureza

Tipo de agua	CaCO_3 (mg/L)
Blanda	0 - 60
Moderadamente dura	61– 120
Dura	121 – 180
Muy dura	>180

Fuente: OMS. 2006.

1.2.3.2 Impactos del agua dura

Se puede perder hasta 2/3 del detergente usado, además los tambores de las lavadoras producen rugosidad causando mayor desgaste de la ropa, provocan manchas de cal en las griferías, vajillas y sanitarios. (AQUASALUD, 2003, <http://www.aquasalud.com/descalcificacion>)

Este tipo de agua puede empeorar las características de los alimentos o bebidas; por ejemplo, en las bebidas y alimentos se pierde gran parte de las sustancias aromáticas ya que forman una unión con el carbonato de calcio, se produce una capa en la superficie del café o té. Motivo por

el cual el agua con elevada dureza produce un sabor desagradable que reportan muchos consumidores (entre 100 a 300 mg/L el sabor es del calcio, sobre 500 mg/L el sabor es desagradable; sobre 170 mg/L existe contenidos de magnesio, asociados a aniones sulfato y cloruro, causantes del sabor amargo). (OMS, 2006, p. 11). Según algunos registros, el agua dura aumenta el tiempo de cocción de los vegetales y la carne. (NEIRA, 2006, p. 11)

1.2.3.3 Impactos del agua blanda

Posee una dureza inferior a 100 mg/L, resulta ser más corrosiva para las tuberías, debido a su reducida capacidad amortiguante, por lo que ciertos metales pesados como plomo, zinc, cadmio y cobre, pueden estar presentes en el agua potable que se distribuye. El pH, alcalinidad y concentración de oxígeno disuelto contribuyen al grado de corrosión y solubilización. (NEIRA, 2006, p. 12)

Aunque pueden presentar algunas ventajas este tipo de guas bien controladas, como el ahorro de energía, eficiencia en sistemas de tuberías y griferías, máximo rendimiento de los electrodomésticos, ahorro en el uso de detergentes y productos de limpieza y disminución de las manchas de cal en sanitarios, cubiertos y vajillas. (NEIRA, 2006, p. 12)

1.2.4 Medios bacteriológicos

Los medios de cultivo que se han apuntado son de composición química conocida (sintética o definidos químicamente), los cuales, se han diseñado para el cultivo de tipos específicos de bacterias conocidas. Se necesita un gran número de sustancias químicamente puras para cultivar bacterias que tengan necesidades nutricionales como los *Lactobacilos*. Aunque para el cultivo de bacterias heterótrofas en laboratorios de rutina, tanto si son similares a las especies de *Escherichia* o de *Lactobacillus*, generalmente se basan en medios de cultivo sintéticos.

1.2.4.1 Tipos de Medios

Aunque muchos de los heterótrofos se desarrollan bien en agar nutritivo o caldo nutritivo, otros no crecen bien, y otros más simplemente no se desarrollan. Algunos heterótrofos tienen requerimientos nutricionales muy elaborados para nutrientes específicos, por ejemplo, vitaminas y sustancias promotoras del crecimiento. A estos organismos se les llama Heterótrofos exigentes.

Además, se necesitan muchos medios de cultivo elaborados para propósitos especiales que facilitan la identificación, aislamiento y cuantificación de ciertos tipos de bacterias. Para conocer estas necesidades, el bacteriólogo cuenta con numerosos medios de cultivo a los cuales, de acuerdo con su función o aplicación, se puede clasificar de la manera siguiente:

Medios enriquecidos: la adición de componentes como sangre, suero o extractos de tejido de animales y plantas al caldo nutritivo o agar, les proporciona sustancias nutritivas complementarias para que el medio pueda soportar el crecimiento de los heterótrofos exigentes.

Medios selectivos: La adición al agar nutritivo de ciertas sustancias químicas específicas, no permitirá el desarrollo de un grupo de bacterias, sin inhibir al mismo tiempo el crecimiento de otros grupos. Por ejemplo, el cristal violeta en concentraciones específicas previene el crecimiento de bacteria grampositivas sin afectar el desarrollo de variedades de gramnegativas.

De manera similar, un medio en el cual la única fuente de carbono sea la maltosa, permite seleccionar las bacterias que pueden asimilarla. En principio, se puede seleccionar las bacterias que solo se desarrollen en presencia de compuestos orgánicos poco comunes agregando dichos compuestos al medio de cultivo y omitiendo todos los demás compuestos de carbono.

Medios Diferenciales: La adición de ciertos reactivos o sustancias químicas a los medios de cultivo trae como resultado determinado tipo de crecimiento bacteriano o de cambios, después de la siembra e incubación del medio, lo cual permite al observador diferenciar distintos tipos de bacterias. Por ejemplo, si se siembra una mezcla de bacterias en un medio agar-sangre, algunas de las bacterias pueden hemolizar (destruir) los glóbulos rojos, mientras que otras no lo hacen.

Cuando aparece una zona clara alrededor de la colonia bacteriana es indicativo de que ocurre la hemólisis. Así es posible distinguir entre bacterias hemolíticas y no hemolíticas que proliferan en el mismo medio. De hecho, el medio agar-sangre sirve simultáneamente como medio de enriquecimiento y diferencial.

Medios de prueba: Para el ensayo de vitaminas, aminoácidos y antibióticos, se utilizan medios de cultivo de composición conocida. Así mismo, se recurre a medios de composición especial para probar desinfectantes.

Medios para cuenta de bacterias: Para determinar el contenido bacteriano de sustancias tales como la leche el agua, se emplean ciertos tipos específicos de medios de cultivo. Se debe señalar su fórmula, así como las especificaciones prescritas.

Medios para caracterizar bacterias: Para determinar el tipo de crecimiento producido por los organismos, así como la capacidad de las bacterias para producir cambios químicos se utiliza de manera convencional una amplia variedad de medios de cultivo.

Medios de mantenimiento: Para preservar satisfactoriamente las características fisiológicas por la viabilidad de un cultivo, quizás se requiere de un medio diferente de aquellos que son utilizados para el crecimiento. El crecimiento rápido y prolífico suele ocasionar la muerte rápida de las células. Por ejemplo, la adición de glucosa a un medio de cultivo, con frecuencia exagera el crecimiento, y probablemente se produce ácido. En un medio de mantenimiento, es preferible suprimir la glucosa.

En relación con su estado físico se puede establecer diferencias más amplias entre los mismos. Se emplean ocasionalmente. Medios sólidos para cultivos especiales de bacterias. Medios sólidos-reversibles a líquidos se ejemplifican con el agar nutritivo. Los medios semisólidos contienen pequeñas cantidades de agar (0,5% o menos), el cual le da a una parte una consistencia de “natilla”. Son ejemplos de medios líquidos el caldo nutritivo como leche desnatada. (PELCZAR, et al., 1982, pp. 92-94).

1.2.4.2 Preparación de los medios

Para el cultivo de las bacterias se recurre a algunas sustancias naturales comunes. En relación con esto, se usa la leche desnatada y no entera. Los materiales, en su forma natural, no presentan ningún problema para tomarlos como medios de cultivo ya que simplemente se depositan dentro de los envases adecuados tales como tuyos de ensayo, o matraces, los cuales deben ser esterilizados antes de utilizarlos. Los medios que se preparan del tipo agar o caldo nutritivo se hacen mezclando los ingredientes individuales necesarios, o de manera más práctica agregando agua a productos deshidratados que contienen todos los ingredientes.

En el comercio podemos encontrar prácticamente todos los medios de cultivo en forma deshidratada.

En la preparación de medios de cultivos deben seguir los siguientes pasos:

- Cada ingrediente, o el medio deshidratado completo, se debe disolver en un volumen adecuado de agua destilada, se recomienda hacer hervir el medio en un reverbero unas tres veces para que el medio se disuelva completamente procurando evitar que se riegue.
- Se determinara el pH del medio y si es necesario se ajustará. El pH se determina por medio de indicadores o potenciómetros.

- El medio se pondrá en recipientes adecuados, como tubos, matraces, botellas, cuyas bocas se cierran con tapones de algodón, plásticos o cubiertas de metal.
- Los medios se esterilizan generalmente en autoclaves a 121 psi durante 15 minutos.
- Transcurrido este tiempo se saca del autoclave y se espera que el medio baje la temperatura hasta que la palma de la mano soporte el calor del medio y se procede en un lugar aséptico a distribuir en las placas, tubos o en algún recipiente de ser necesario.

1.2.5 Peligros microbianos relacionados con el agua de consumo.

Son más comunes y extendidos este tipo de peligros, por lo que en función la población expuesta, su infectividad y la gravedad de la enfermedad o enfermedades infecciosas causadas por agentes patógenos como parásitos (helmintos, protozoos, etc.), bacterias y virus, se da la carga para la salud pública.

Son detectables las epidemias con una contaminación del agua a gran escala ocasionada por un fallo general en el sistema de protección de seguridad del abastecimiento de agua. Las autoridades de la salud pública en vigilancia no asocian a la fuente de abastecimiento de agua con los brotes esporádicos que pueden ser ocasionados por repetidas contaminaciones leves u otras averías, causantes de enfermedades. (OMS, 2006, p. 105)

1.2.5.1 Infecciones transmitidas por el agua

Por el agua de consumo contaminada puede transmitirse diversos tipos de agentes patógenos y son de interés si nos referimos a la salud de los seres vivos. Como parte de la flora de las bacterias heterótrofas en los sistemas acuáticos pueden encontrarse estas bacterias patógenas oportunistas. Los agentes patógenos y la importancia en los sistemas de abastecimiento de agua de consumo se mencionan en el tabla 2-2 y la figura 2-2 (REASONER, 1998, p. 3).

La existencia de una gran variedad de agentes patógenos permite tomar en cuenta la distinta inmunidad de las personas, factores como el sexo, edad, estado de salud y condiciones de vida, adquirida por contacto con un agente patógeno o determinada, ya que la mayoría de bacterias no son patógenas para los seres humanos “sanos”. Por lo tanto, en individuos susceptibles, inmunológicamente débiles se desarrolla la enfermedad. (REASONER, 1998, p. 3)

Además, los microbiólogos sanitarios no se preocupan por las heridas con infecciones en la garganta, oídos, nariz, ojos u infecciones generalizadas en el cuerpo causadas por agentes

transmitidos por el agua y dan mayor importancia a los trastornos gastrointestinales causada por agentes. (REASONER, 1998, p. 3).

La contaminación fecal no es el único indicador de la inocuidad del agua de consumo. En las redes de distribución del agua proliferan algunos microorganismos (por ejemplo, *Legionella*), en las aguas de origen podemos encontrar el dracunculo, (*Dracunculus medinensis*), causante de epidemias y casos aislados. Y se deben adoptar medidas de gestión específicas en caso de otros microbios (las cianobacterias tóxicas como ejemplo). (OMS, 2006, p. 107)

Tabla 2-2: Agentes patógenos importantes en el agua y en sistemas de abastecimiento de agua.

Agente patógeno	Importancia para la salud	Persistencia en los sistemas de abastecimiento de agua ^a	Resistencia al cloro ^b	Infectividad relativa ^c	Fuente animal importante
Bacterias					
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	Baja	Puede proliferar	Baja	Baja	No
<i>Campylobacter jejuni</i> , <i>C. coli</i>	Alta	Moderada	Baja	Moderada	Sí
<i>Escherichia coli</i> patógena ^d	Alta	Moderada	Baja	Baja	Sí
<i>E. coli</i> enterohemorrágica	Alta	Moderada	Baja	Alta	Sí
<i>Legionella</i> spp.	Alta	Moderada	Baja	Moderada	No
Micobacterias no tuberculosas	Baja	Prolifera	Alta	Baja	No
<i>Pseudomonas aeruginosae</i>	Moderada	Prolifera	Moderada	Baja	No
<i>Salmonella typhi</i>	Alta	Puede proliferar	Baja	Baja	No
Otras salmonelas	Alta	proliferar	Baja	Baja	Sí
<i>Shigella</i> spp.	Alta	Moderada	Baja	Moderada	No
<i>Vibrio cholerae</i>	Alta	Puede proliferar	Baja	Baja	No
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Alta	proliferar	Baja	Baja	Sí
		Corta			
		Corta			
		Larga			
Virus					
Adenovirus	Alta	Larga	Moderada	Alta	No
Enterovirus	Alta	Larga	Moderada	Alta	No
Virus de la hepatitis A	Alta	Larga	Moderada	Alta	No
Virus de la hepatitis E	Alta	Larga	Moderada	Alta	Potencialmente
Norovirus y sapovirus	Alta	Larga	Moderada	Alta	Potencialmente
Rotavirus	Alta	Larga	Moderada	Alta	No
Protozoos					
<i>Acanthamoeba</i> spp.	Alta	Larga	Alta	Alta	No
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Alta	Larga	Alta	Alta	Sí
<i>Cyclospora cayetanensis</i>	Alta	Larga	Alta	Alta	No
<i>Entamoeba histolytica</i>	Alta	Moderada	Alta	Alta	No
<i>Giardia intestinalis</i>	Alta	Moderada	Alta	Alta	Sí
<i>Naegleria fowleri</i>	Alta	Puede proliferar ^f	Alta	Alta	No
<i>Toxoplasma gondii</i>	Alta	proliferar ^f	Alta	Alta	Sí
		Larga			
Helmintos					
<i>Dracunculus medinensis</i>	Alta	Moderada	Moderada	Alta	No
<i>Schistosoma</i> spp.	Alta	Corta	Moderada	Alta	Sí

Nota: La transmisión por el agua de los agentes patógenos incluidos en el cuadro ha sido confirmada mediante estudios epidemiológicos e historias clínicas. La comprobación de la patogenicidad se basa, en parte, en la reproducción de la enfermedad en hospedadores adecuados. El valor de la información de estudios experimentales en los que se expone a voluntarios a concentraciones conocidas de agentes patógenos es relativo; como la mayoría de los estudios se realizan con voluntarios adultos sanos, la información obtenida sólo es aplicable a una parte de la población expuesta y la extrapolación a grupos más vulnerables debe estudiarse más a fondo.

^a Periodo de detección del estado infeccioso en agua a 20 °C: persistencia corta: hasta 1 semana; moderada: de 1 semana a 1 mes; larga: más de 1 mes.

^b Estando el estado infeccioso en suspensión libre en agua tratada con dosis y tiempos de contacto convencionales. La resistencia es «moderada» si es posible que el agente no sea destruido completamente.

^c Determinada en experimentos con voluntarios o basándose en información epidemiológica.

^d Incluye los tipos enteropatógenos, enterotoxígenos y enteroinvasivos.

^e La vía de infección principal es por contacto con la piel, pero puede infectar a enfermos de cáncer o personas inmunodeficientes por vía oral.

^f En agua templada.

Fuente: (OMS, 2015)

Por inhalación de gotículas de agua (aerosoles) se producen ciertas enfermedades graves donde los microorganismos causantes de la enfermedad pueden multiplicarse si existen nutrientes y temperatura cálida. Ejemplos de este tipo de enfermedades tenemos a la legionelosis («enfermedad del legionario» o legionelosis neumónica, ocasionadas por *Legionella spp.*), las enfermedades por la ameba *Naegleria fowleri* (meningoencefalitis amebiana primaria [MAP]) y por *Acanthamoeba spp.* (meningitis amebiana, infecciones pulmonares). (OMS, 2006, p. 107).

Una enfermedad parasitaria de importancia en las regiones subtropicales y tropicales es la esquistosomiasis (bilharziasis), transmitida principalmente por contacto con el agua, o por la larva del parásito (cercaria) que es liberada por caracoles acuáticos infectados pueden penetrar en la piel. Factores como la disponibilidad de agua inocua, reducir el contacto con agua contaminada, por ejemplo, el uso del agua para lavar la ropa o la higiene personal, al recogerla para transportarla al hogar favorece la prevención de la enfermedad. (OMS, 2006, p. 107)

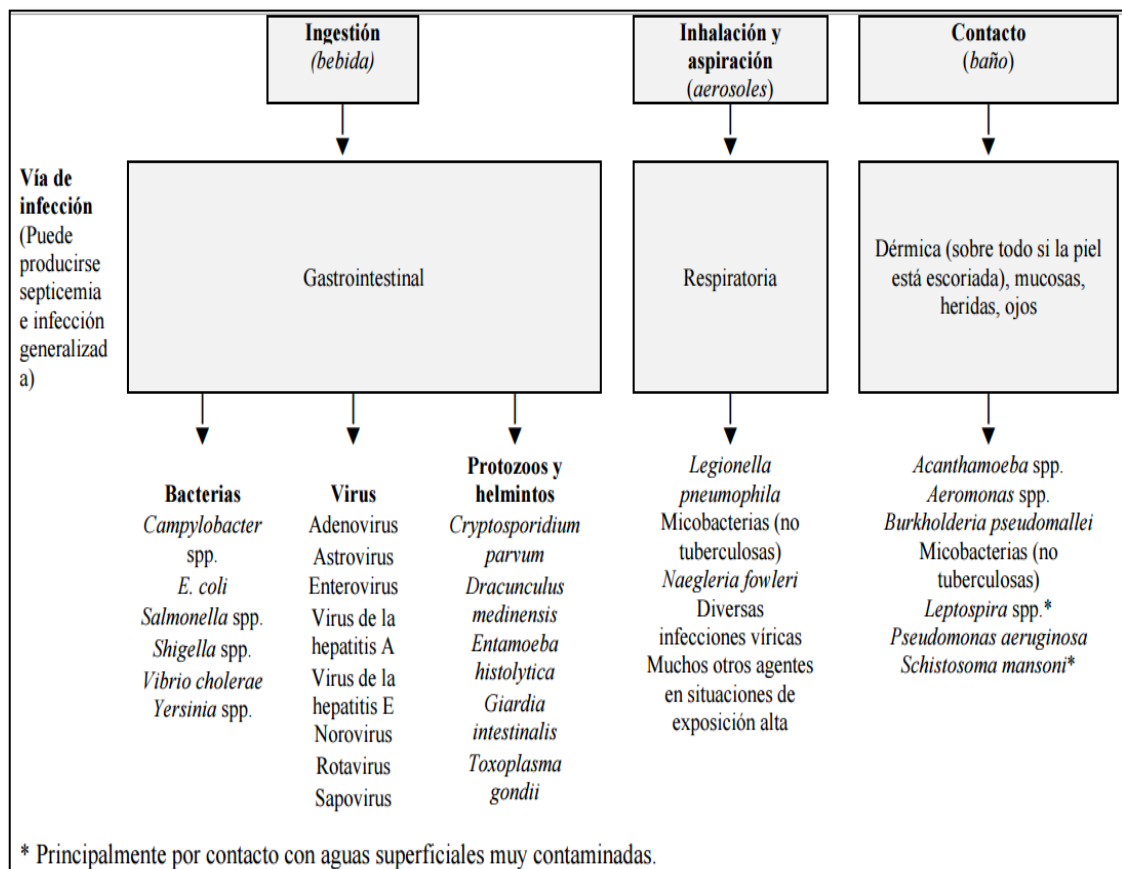


Figura 2-2: Ejemplos de agentes patógenos y vías de transmisión relacionados con el agua
Fuente: (OMS, 2006).

Otro tipo de infecciones parasitarias tales como la balantidiasis (*Balantidium coli*) y determinados helmintos (*Trichuris*, *Echinococcus*, *Fasciola*, *Strongyloides*, *Fasciolopsis*, *Necator Spirometra*, *Ascaris*, *Toxocara*, *Ancylostoma* y la especie *Taenia solium*) puede actuar

como vehículo debido al consumo de agua insalubre, contaminada con tierra o heces; pero la transmisión normal de gran parte de estas especies es la ingestión de los huevos que se encuentran en alimentos contaminados ya sea con heces o tierra infectada con estas, por ejemplo, al consumir carne de cerdo no cocinada que contenga cisticercos de *Taenia solium*. (OMS, 2006, p. 107).

Mientras que a personas con inmunodeficiencia sistémica o local, como bebés o ancianos, personas afectadas por el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), pacientes con quemaduras o heridas extensas, sometidas a tratamientos inmunodepresores pueden enfermar a causa de agentes patógenos que suelen estar presentes de forma natural en el medio ambiente, no obstante el agua que beben o usan para bañarse puede contener suficientes cantidades de estos organismos para producir algunas infecciones en las mucosas de los oídos, garganta, ojos, nariz y en la piel. Ejemplos de agentes patógenos de este tipo tenemos los géneros *Serratia*, *Klebsiella*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Aeromonas* y la especie *Pseudomonas aeruginosa* y determinadas micobacterias (no tuberculosas) de crecimiento lento (OMS, 2006, p. 108).

La mayoría de los agentes patógenos del ser humano, están distribuidos por todo el mundo; no obstante, algunos son endémicos de determinadas regiones, como los que ocasionan epidemias de cólera o dracunculosis y probablemente no estén incluidos otros patógenos ya que el número de patógenos propagados por el agua conocidos continúa aumentando conforme se descubren patógenos no identificados anteriormente o nuevos. (OMS, 2006, p. 108)

1.2.5.2 Peligros de tipo químico en el agua de consumo

Se ha demostrado que en la salud de las personas causan efectos adversos cierto número de contaminantes químicos por causa de una exposición prolongada por el agua de consumo. Sin embargo, sólo se trata de una muy pequeña cantidad de las sustancias químicas que pueden estar presentes en el agua de consumo procedentes de diversas fuentes. (OMS, 2006, p. 127).

La aceptabilidad del agua de consumo es afectada por ciertas sustancias consideradas peligrosas para la salud, que generalmente, conllevan al rechazo del agua que contiene concentraciones bastante menores que las consideradas peligrosas para la salud, tales sustancias se necesitan por ejemplo para interpretar los datos recopilados en respuesta a reclamaciones de los consumidores. (OMS, 2006, p. 127)

1.2.5.3 Aspectos relativos a la aceptabilidad

Los contaminantes químicos naturales, inorgánicos u orgánicos, fuentes o procesos biológicos (microorganismos acuáticos), o del tratamiento del agua (cloración), o resultado de la corrosión o la contaminación debida a sustancias químicas sintéticas, pueden ser los causantes del sabor y el olor del agua. También pueden desarrollarse sabores y olores durante el almacenamiento y la distribución debidos a la actividad microbiana. (OMS, 2006, p. 183).

La presencia de algún tipo de contaminación, o el funcionamiento deficiente de algún proceso en el tratamiento o distribución del agua pueden ser indicadores y revelar mediante los sabores u olores del agua de consumo y puede indicar la presencia de sustancias potencialmente dañinas. Se debe consultar a las autoridades de salud pertinentes e investigar la causa principalmente si el cambio experimentado es substancial o repentino. Los consumidores también lo pueden percibir en el agua mediante la aceptabilidad ya que puede afectar a la calidad el cambio de aspectos como la turbiedad, color, partículas u organismos visibles. (OMS, 2006, p. 184)

1.2.5.4 Tratamiento a los problemas de sabor, olor y aspecto

Suelen eliminar eficazmente sustancias orgánicas que causan sabores y olores los tratamientos de agua como: Aeración, carbón activado (granular o en polvo) y ozonización. (OMS, 2006, p. 189) Un ajuste cuidadoso en los procesos de desinfección es el mejor modo de controlar los sabores y olores causados por desinfectantes y por SPD. Se pueden eliminar en principio con carbón activado. La dureza del agua se puede reducir (ablandamiento) mediante precipitación o por intercambio de cationes. (OMS, 2006, p. 190)

Mediante cloración y posterior filtrado se puede eliminar el manganeso. La aeración, filtración, tratamiento con carbón activado granular y oxidación son técnicas utilizadas para eliminar el sulfuro de hidrógeno. La nitrificación biológica puede eliminar el amoníaco. Generalmente no se pueden eliminar otras sustancias inorgánicas causantes del sabor y olor (cloruro y sulfato). (OMS, 2006, p. 190)

1.2.6 Antimicrobianos

La Organización Mundial de la Salud (2011) los define como “medicamentos utilizados para tratar las infecciones producidas por virus, bacterias, hongos o parásitos”. (OMS, 2011, <http://www.who.int/world-health-day/2011/world-health-day2011-brochure-es.pdf>). Y según la definición de Girón

Walther son “medicamentos que destruyen los microorganismos o impiden su desarrollo o multiplicación”. (DORLAND, 1993, p. 54)

Su descubrimiento es uno de los principales avances en la historia de la salud humana, los cuales han salvado y aliviado el sufrimiento de millones de vidas en los últimos 70 años. En este grupo se encuentran algunos antiparasitarios, antivíricos, antifúngicos y agentes quimioterapéuticos. (OMS, 2011, <http://www.who.int/world-health-day/2011/world-health-day2011-brochure-es.pdf>).

1.2.6.1 Clasificación

Estos fármacos, se dividen en antirretrovirales, antivirales, antibacterianos antimicóticos antiparasitarios y antimicobacterianos. El aumento a la resistencia de los microorganismos a estos medicamentos en los últimos años, debido primordialmente a la falta de conocimiento de los médicos sobre ellos, especialmente de los más utilizados como los antibacterianos, se debe conocer en qué situaciones se puede aplicar y cómo actúan cada uno. (GIRÓN, 2008, p. 70)

Clasificación según su efecto

Bacteriostático: Son aquellos que impiden la multiplicación y desarrollo bacteriano pero sin llegar a matar ni destruir las células.

Bactericidas: letal, llevando a la lisis bacteriana.

Clasificación según el espectro de acción

Amplio: Se denomina así aquellos antibióticos que posee efecto activo sobre un amplio número de géneros y especies diferentes.

Reducido: Aquellos antibióticos que solo posee efectos activos sobre un grupo reducido de especies. (SEIJA & VIGNOLI, 2009, p. 632)

Clasificación según el mecanismo de acción

Se toma en consideración la capacidad de destruir una célula bacteriana o inhibir el crecimiento que son mecanismos de un antibiótico. (ver Figura 3-1).

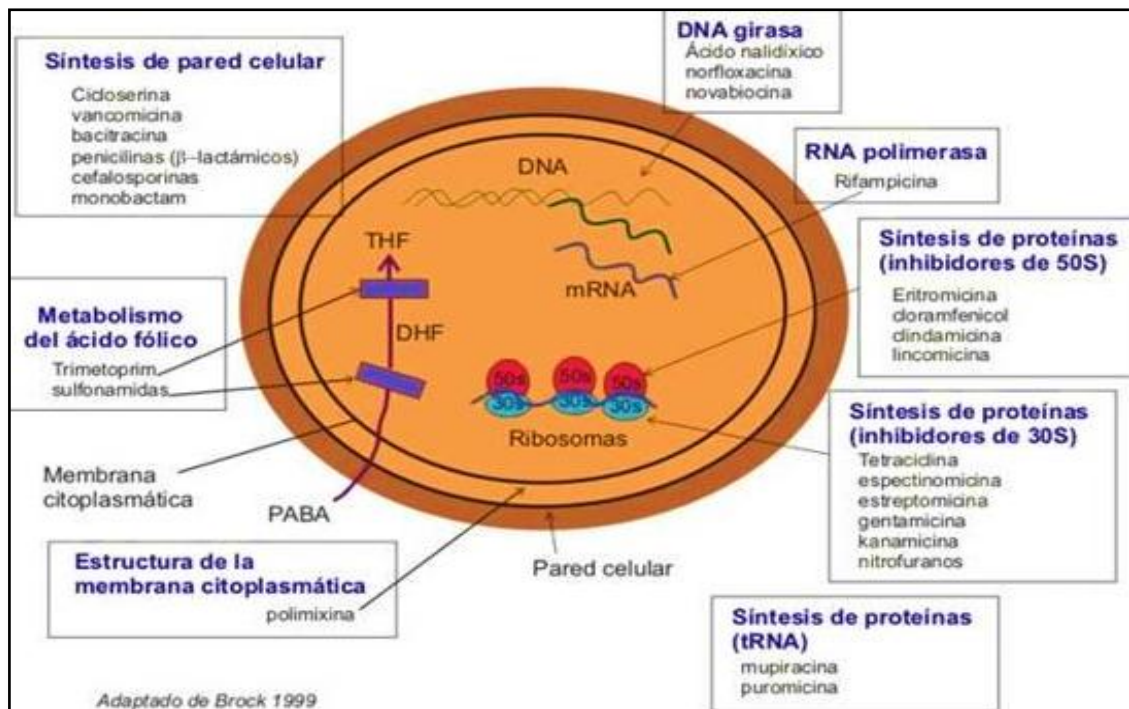


Figura 3-1: Sitios de acción de los antimicrobianos

Fuente: Brock, 1999.

Se dividen en:

- Inhibidores de la duplicación del ADN
- Inhibidores de la formación de la pared bacteriana
- Inhibidores de vías metabólicas
- Inhibidores de la síntesis proteica,
- Inhibidores de la membrana citoplasmática. (SEIJA & VIGNOLI, 2009, p. 632)

1.2.7 Grupos de antibióticos de importancia:

1.2.7.1 Betalactámicos

Este grupo se caracteriza por poseer en su estructura un anillo betalactámico y son de origen natural o semisintético. (Ver Figura 4-1). En la síntesis de la pared celular bacteriana actúan inhibiendo la última etapa. Se trata de compuestos que poseen un amplio margen terapéutico constituyendo de esta manera la familia más numerosa de antimicrobianos, ya que tienen una acción bactericida lenta, presentan escasa toxicidad y su acción es relativamente independiente de la concentración plasmática (SEIJA & VIGNOLI, 2009, p. 634)

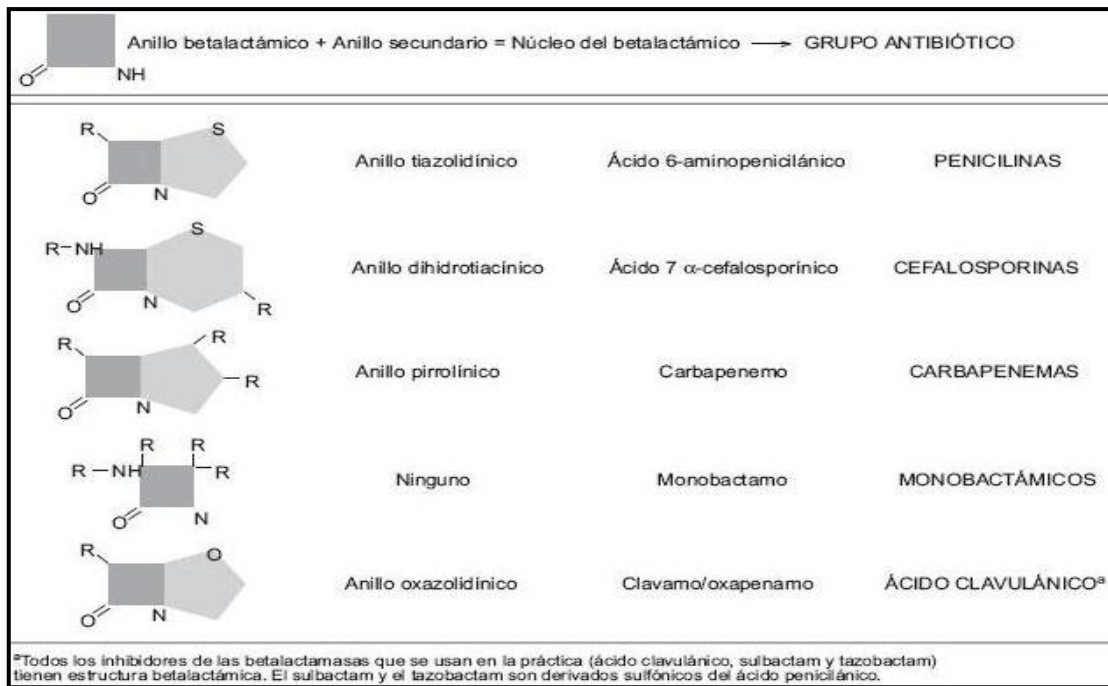


Figura 4-1: Estructura química de los betalactámicos

Fuente: Suárez, C; Gudol, F; enferm Infecc Microbiol Clin. 2009, pag 118

A lo largo de los años su espectro se ha ido ampliando por la incorporación de nuevas moléculas que presentan mayor acción frente a los bacilos gramnegativos; pero su uso empírico y su eficacia en determinadas situaciones se ha limitado debido a la progresiva aparición de resistencias adquiridas. (SEIJA & VIGNOLI, 2009, p. 634).

BETALACTÁMICOS			
PENICILINAS:			
P. naturales		Acilaminoureido-penicilinas	
Benzilpenicilina		Piperacilina	
Penicilina V (vía oral)			
Aminobencil-penicilinas		Penicilinas resistentes a penicilinas estafilocócica	
Ampicilina		Meticilina	
Amoxicilina		Cloxacilina	
CEFALOSPORINAS:			
1ª generación	2ª generación	3ª generación	4ª generación
Cefazolina	Cefuroxima	Cefotaxima	Cefepima
	Cefoxitina	Ceftriaxona	Cefpiroma
		Ceftazidima	
MONOBACTÁMICOS:		CARBAPENEMICOS:	
Aztreonam		Imipenem	
		Meropenem	
		Ertapenem	
		Doripenem	
INHIBIDORES DE BETALACTAMASA			
Ac. Clavulánico: Amoxicilina + Ácido Clavulánico			
Sulbactam: Ampicilina + Sulbactam			
Tazobactam: Piperacilina + Tazobactam			

Figura 5-1: Clasificación de los betalactámicos

Fuente: (MICROSALUD, 2010)

1.2.7.2 *Glucopéptidos*

En la actualidad hay dos drogas en uso clínico: vancomicina y teicoplanina. Su mecanismo de acción es en la pared bacteriana, actúa inhibiendo su síntesis y al formar un complejo con la porción D-alanina-D-alanina del pentapéptido precursor inhibe el ensamblado en la segunda etapa del peptidoglicano en dicho sitio. Además altera la permeabilidad de la membrana citoplasmática y la síntesis del ARN al dañar los protoplastos. (SEIJA & VIGNOLI, 2009, p. 640).

Glicopéptidos y Lipopéptidos Vancomicina Teicoplanina Daptomicina

Figura 6-1: Clasificación de los Glicopéptidos
Fuente: (MICROSALUD, 2010)

1.2.7.3 *Aminoglucósidos*

Compuestos por dos o más aminoazúcares unidos a un anillo aminocitol mediante enlaces glucosídicos. Se clasifican en familias según los aminoazúcares. Son muy polares, policationes solubles en agua y por lo general estables a cambios de pH de 5 a 8 y al calor. (SEIJA & VIGNOLI, 2009, p. 640)

Su mecanismo de acción consiste en la unión irreversible a la subunidad 30S del ribosoma, provocando una interferencia en la exacta lectura del código genético, por lo tanto bloquea la síntesis proteica de la bacteria. La coadministración de antibióticos que causan la inhibición de la síntesis de la pared bacteriana, como los glicopéptidos y betalactámicos aumenta su acción cuando se incorpora aminoglucósidos en el interior de la bacteria, especialmente en cocos grampositivos. (SEIJA & VIGNOLI, 2009, p. 641)

1.2.7.4 *Macrólidos*

Son un grupo de antibióticos que poseen estructura diferente pero comparten un mecanismo de acción similar, así tenemos a la eritromicina, claritromicina, azitromicina, los cetólidos, las lincosaminas (lincomicina y clindamicina) y las estreptograminas. (SEIJA & VIGNOLI, 2009, p. 643)
Según su mecanismo de acción, estos antibióticos se unen de forma reversible a la subunidad 50S del ARN ribosómico. Entre los diferentes radicales de hidroxilo del macrólido y determinadas bases del ARNr forman los puentes de hidrógeno. Esta unión provoca un bloqueo en las reacciones de translocación y transpeptidación. (SEIJA & VIGNOLI, 2009, p. 644)

MACROLIDOS/CETOLIDOS	AMINOGLUCOSIDOS
Eritromicina	Estreptomina
Roxitromicina	Gentamicina
Azitromicina	Amicacina
Claritromicina	Tobramicina
Josamicina	
Telitromicina	

Figura 7-1: Clasificación de los Macrólidos y AminoglucoSIDOS.
Fuente: (MICROSALUD, 2010)

1.2.7.5 *Quinolonas*

Antibióticos bactericidas que inhiben la síntesis de ADN y a altas concentraciones también al ARN, actúan en la inhibición del ADN-girasa, enzima que cataliza el superenrollamiento del ADN cromosómico y asegura una adecuada división celular. Su estructura molecular básica consta de una doble estructura de anillo y en la posición 1 contiene un residuo N, a partir de esta estructura derivan el resto, como por ejemplo al introducir residuos de flúor, han derivado desde el ácido nalidíxico hasta quinolonas fluoradas. (SEIJA & VIGNOLI, 2009, p. 644).

Su mecanismo de acción es interactuar con la ADN-girasa y la topoisomerasa IV que son dos sitios diferentes pero relacionados dentro de la célula bacteriana. En la ADN-girasa la inhibición ocurre rápidamente y es más sensible a la acción de las quinolonas sobre los gérmenes gramnegativos, mientras que en la topoisomerasa IV la inhibición ocurre más lentamente y en grampositivos es la más sensible. Esto ocurre debido a que las quinolonas poseen la habilidad de estabilizar los complejos de ADN y topoisomerasas II. (SEIJA & VIGNOLI, 2009, p. 646)

1.2.8 *Resistencia a antibióticos*

También denominada farmacorresistencia, se produce dejan de ser eficaces los medicamentos utilizados para curar las infecciones al sufrir cambios los microorganismos (parásitos, hongos, bacterias o virus). Ultrarresistentes es un fenómeno muy alarmante ya que las infecciones causadas por este tipo de microorganismos pueden causar la muerte, transmitirse a otras personas y esto a su vez genera elevados costos tanto para la sociedad como para los pacientes, este término se designa a aquellos microorganismos resistentes a la acción de gran parte de antimicrobianos.

La resistencia a los antimicrobianos se ve facilitada a la aparición y propagación debido a factores como:

- El uso inadecuado de los medicamentos, como, por ejemplo, al no finalizar los tratamientos ordenados o tomar dosis insuficientes.
- Los medicamentos de mala calidad.
- Las prescripciones equivocadas o deficiencias en la prevención de enfermedades.
- Deficiencia en el control de las infecciones, por ejemplo al referirse a los gobiernos existe insuficiencias en la vigilancia y la reducción del depósito de instrumentos terapéuticos de diagnósticos y preventivos, la falta de constancia en la lucha contra este tipo de problemas, los cuales dificultan el control de la farmacorresistencia. (OMS, 2011, <http://www.who.int/world-health-day/2011/world-health-day2011-brochure-es.pdf>).

1.2.8.1 Tipos de resistencia

Puede ser natural (intrínseca), adquirida o cruzada.

La resistencia natural.- Es propia de cada familia, especie o grupo bacteriano. Se efectúa por selección natural (en una población la reproducción diferencial de los genotipos) a través de mutaciones producidas al azar. Por ejemplo, los gérmenes gramnegativos son resistentes a la vancomicina y esta situación no es variable. (SEIJA & VIGNOLI, 2009, p. 650).

La resistencia adquirida.- Es variable y es adquirida por una cepa de una especie bacteriana, al no afectar totalidad solo a algunos integrantes de una determinada especie.

- Cromosómica: Se produce por mutación espontánea en un locus que controla la susceptibilidad al antibiótico, produciendo un cambio genético constante.
- Extracromosómica: Se produce cuando el material genético se incorpora por el exterior del cromosoma (plásmidos o transposones). Transferencia de genes resistentes. (APAZA & GARCÍA, 2013, p. 6).

La resistencia cruzada.- Los microorganismos presentan resistencia a varios antibióticos de un grupo que tiene un mecanismo de acción parecido o con estructura similar. (MORENO, 2014, <http://es.slideshare.net/HansJc/mecanismo-de-accin-de-los-antibioticos>)

1.2.8.2 Resistencia en el ambiente

Un estudio realizado en Inglaterra en el río Támesis por científicos de la Universidad de Warwick y la Universidad de Exeter, mencionan que la resistencia a los antibióticos podría ser desarrollada por bacterias de los ríos y arroyos, es decir por causa medioambiental. Al analizar muestras de sedimentos y agua de 13 lugares a lo largo de la cuenca del este río, para predecir la distribución de las bacterias resistentes a los antibióticos desarrollaron modelos detallados, observando que existía un mayor número de bacterias resistentes a los antibióticos cerca de algunas depuradoras de aguas residuales y que son probablemente responsables de al menos la mitad del aumento observado. Se liberan cada vez cantidades mayores de antibióticos de uso humano y agrícola. Las actividades agrícolas (incluidos los fertilizantes y los purines), forman parte de la escorrentía superficial que es arrastrada a los ríos por las lluvias. (AMOS, et al., 2015, pp 70).

Además descubrieron que varios otros factores afectaban a la prevalencia de la resistencia a los antibióticos, como la cubierta vegetal y los cambios en las precipitaciones. Por ejemplo, en un sitio rodeado de pastizales las lluvias fuertes aumentan los niveles de resistencia; mientras que en sitios rodeados de bosques las lluvias fuertes reducen los niveles detectados (AMOS, et al., 2015, p. 72).

Según la profesora de la Universidad de Warwick, y co-líder de la investigación Elizabeth Wellington, explica en la nota de prensa: "La resistencia a antibióticos se produce de forma natural en el ambiente, pero aún no sabemos cómo afectan los desechos humanos y agrícolas a su desarrollo. Han descubierto que las descargas de aguas residuales afectan a los niveles de resistencia y las mejoras en los procesos de tratamiento podrían ser cruciales para reducir la prevalencia de bacterias resistentes en el medio ambiente. También han encontrado resistencia a los antibióticos en el grupo Enterobacteriaceae, que incluye bacterias intestinales y patógenos. (AMOS, et al., 2015, p. 72).

Mientras que el co-autor de la investigación de la Universidad de Exeter, Escuela de Medicina, William Gaze, añade: "Nuestra investigación ha arrojado más luz sobre los vínculos entre contaminantes ambientales y la resistencia a los antibióticos. Permitiendo descubrir una asociación entre varios compuestos -como el zinc, fósforo y silicio- y dicha resistencia. Creemos que las bacterias que han desarrollado capacidad para sobrevivir en ambientes ricos en metales también pueden poseer mecanismos de resistencia a los antibióticos, lo que indica la complejidad de este problema global". (AMOS, et al., 2015, p. 73).

1.2.8.3 Fuentes de los antibióticos en el ambiente

A pesar de los beneficios de conservar una sociedad saludable de microorganismos (mediante vacunas, jarabes, pastillas, métodos de diagnóstico o prevención, etc.). Al ambiente añadimos cada semana más de 1 millón de libras (453.600Kg) de agentes antibacteriales y antibióticos. Varios estudios han mostrado que las rutas por donde entran al ambiente los agentes antimicrobianos, ha causado cambios en la susceptibilidad de los microorganismos en los diferentes ambientes y/o a los microorganismos predominantes. (MEADE-CALLAHAN, 2001, http://www.actionbioscience.org/esp/evolucion/meade_callahan.html).

Aguas servidas. Nuestro cuerpo al no procesar todos los antibióticos que ingerimos, estos son expulsados como desecho y llegan a las plantas de tratamiento de agua. Una publicación muestra que existe cerca de 46.4% bacterias resistentes a múltiples antibióticos que fueron aisladas del material de desecho proveniente del tratamiento del agua de una planta de tratamiento. También contribuye a dicha resistencia las aguas servidas de las plantas de tratamiento provenientes de las fábricas farmacéuticas y de hospitales.

Además ponen de manifiesto la existencia de mayor porcentaje de bacterias resistentes a los antibióticos en aguas que fluyen de las áreas agrícolas y en los ríos contaminados con efluentes urbanos y menor porcentaje de este tipo de bacterias en las zonas río arriba de las fuentes de la contaminación. En los ríos, debido al incremento de metales pesados en los desechos industriales esta resistencia es indirectamente seleccionada.

Desechos médicos. Es inevitable producir desechos en la prescripción de antibióticos en los establecimientos médicos. Este tipo de descargas han manifestado un incremento en las colonias de bacterias resistentes a ciertos antibióticos como por ejemplo la oxitetraciclina.

Producción. Su venta en el mundo es alrededor de \$8,000 millones al año. Indicando que se producen 50 millones de libras (22,68 millones de Kg) cada año, de esta cantidad el 50% es para la demanda humana. Se relacionan con un incremento de la resistencia a antibióticos (simple o múltiple) en microorganismos indicadores con las descargas de agua de desecho de las plantas farmacéuticas.

Uso en los cultivos. Cada año son usados los antibióticos en las plantas de producción aproximadamente 300,000 libras (136.080Kg.). Son utilizados en cultivos de alto valor de forma fumigada o atomizada, por ejemplo, para prevenir infecciones bacterianas en árboles

frutales, cuando se fumiga a la fruta no todo le llega, gran parte de los antibióticos terminan en el suelo y al final llegan a las aguas subterráneas.

Productos caseros. Se han introducido más de 700 productos “antibacteriales” al mercado, para el uso doméstico (incluye plásticos para la cocina, pasta dentífrica, cemento, medias deportivas y pinturas) en los últimos 5 años. En estos productos los ingredientes antibacteriales más comunes son blanqueadores, compuestos amoniacales cuaternarios, triclosán y alcohol. Ha sido evidenciada en algunos patógenos humanos y en la naturaleza la resistencia de los microorganismos a cada uno de estos compuestos. Estos productos después de ser usados en nuestras casas casualmente vienen a parar en las aguas servidas o en los basureros.

Producción animal. Para promover el crecimiento de los animales, los antibióticos son agregados frecuentemente a niveles sub-terapéuticos en el alimento animal. También en las aguas en acuicultura son añadidos. Los animales que consumimos cada año reciben unos 24 millones de libras (casi 11 millones de Kg.) de antibióticos. En nuestro alimento existe resistencia a los antibióticos y debido a esta práctica se ha convertido en una preocupación a nivel de salud.

Debido al aumento del uso de antibióticos en los animales ha aumentado clínicamente bacterias resistentes a medicamentos como *Enterococcus*, *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli*. De igual manera debido al consumo de alimentos provenientes de animales tratados, nuestra microbiota entérica normal posiblemente esté ganando resistencia a los antibióticos.

En Europa, el aumento de (VRE), resistencia a la vancomicina en diferentes especies de *Enterococcus* (causan infecciones post-quirúrgicas), ocasionada por el uso de avoparcina, un antibiótico promotor del crecimiento en animales. Un estudio ha verificado que raramente en la carne molida de cerdo y res ocurre VRE. Se ha verificado que en la acuicultura, el uso de oxitetraciclina causa un cambio estacional en las especies de bacteria hacia las *Enterobacteriaceae*, además de presentar un aumento en la resistencia a los antibióticos. (MEADE-CALLAHAN, 2001, http://www.actionbioscience.org/esp/evolucion/meade_callahan.html).

1.2.9 Resistomas

Los biólogos lo emplean para describir la recopilación de todos los genes y sus precursores de resistencia a los antibióticos en bacterias no patógenas como patógenas. (EFE, 2012, pp 25)

Una publicación en la revista Science en la Universidad Washington, en St. Louis, Missouri, Escuela de Medicina el Centro para Ciencias del Genoma y Biología de sistemas, encabezado

por Kevin Forsberg, manifiestan que las bacterias intercambian rápidamente los genes que presentan resistencia a varios medicamentos y benefician a la progresiva ineficacia de los antibióticos, en las bacterias presentes en el suelo y las que enferman a los humanos. (EL UNIVERSAL, 2012, <http://www.eluniversal.com/vida/120830/bacterias-del-suelo-contribuyen-al-desarrollo-de-resistencia-a-antibio>)

Los investigadores señalaron que "Uno de los orígenes evolutivos antiguos de la resistencia a los antibióticos representan los microbios del suelo", por lo tanto el hábitat más diverso y grande en el planeta es el suelo terrestre, añadiendo que "son un reservorio de genes de resistencia utilizables para el intercambio con los patógenos clínicos". Además que "es un problema clínico de gran importancia los patógenos humanos ya que están evolucionando continuamente y la propagación de genes resistentes a los antibióticos es amplia". (EFE, 2012, p. 30).

Los antibióticos que se utilizan en la agricultura y la crianza de ganado tienen un extenso contacto directo con el suelo. Entre las actinobacterias presentes en el suelo las bacterias del género *Streptomyces* son las más extensas, esta especie representa la gran parte de todos los antibióticos producidos naturalmente, cuyo hábitat natural es el suelo y la vegetación descompuesta, esto se puede distinguir por el "olor a tierra húmeda" resultado de la producción de geosmina, un metabolito volátil. (EL UNIVERSAL, 2012, <http://www.eluniversal.com/vida/120830/bacterias-del-suelo-contribuyen-al-desarrollo-de-resistencia-a-antibio>).

Para la identificación de siete genes de resistencia en las bacterias del suelo de granjas, Forsberg y sus colegas emplearon la secuencia metagenómica, la cual comparte una semejanza perfecta con los genes de resistencia en varias especies bacterianas, como por ejemplo de cepas de *Klesbsiella pneumoniae*, *Salmonella* y otros patógenos. (EL UNIVERSAL, 2012, <http://www.eluniversal.com/vida/120830/bacterias-del-suelo-contribuyen-al-desarrollo-de-resistencia-a-antibio>).

También encontraron que las resistencias múltiples presentan genes agrupados y flanqueados por elementos móviles del ADN, los cuales permiten a los genes la transferencia entre las bacterias. (EFE, 2012, p. 31).

El artículo agrega "El suelo se considera una fuente directa y de importancia clínica los resistomas del suelo, ya que por su intercambio independiente entre los genes de resistencia de los patógenos del suelo a los de la clínica o viceversa, por ejemplo al transferir la resistencia a los organismos del suelo, varios pueden causar infecciones nosocomiales (obtenidas en hospitales) y pueden emerger como patógenos". (EFE, 2012, p. 32).

Science, indican en los resultados la contaminación del agua y el suelo con los altos niveles de antibióticos que contienen los desechos, al igual que el excesivo uso de antibióticos en la crianza del ganado, seguramente las bacterias presentes en el ambiente contribuyen a la selección de genes de resistencia a los antibióticos. (EFE, 2012, p. 32).

1.2.10 Aislamiento de bacterias resistentes a antibióticos del agua.

Según los métodos realizados por CASTILLO, Liseth, MARTÍNEZ Ricardo A, LÓPEZ Lucía, TICANTE José A. y MUÑOZ Andrés A. En su investigación sobre el “Aislamiento y selección de *coliformes fecales* resistentes a antibióticos provenientes de dos plantas de tratamiento de aguas residuales de la ciudad de Puebla” utilizaron agar Mueller Hinton con 4 diferentes antibióticos Cloranfenicol (Cm,10 ppm), Kanamicina (Km, 10 ppm), Tetraciclina (Tc, 10 ppm), Ampicilina (Ap, 50 ppm) y sin antibiótico también para las pruebas de multiresistencia pero a concentraciones de Km (10ppm), Ap (100 ppm), Cm (30 ppm), Tc (30 ppm), agar MacConkey, agar Cetrimida (100 mg/l) para *Pseudomonas* en la selección de las bacterias, el método de dilución en placa se usó solución salina isotónica (0.85%).

Para la identificación se utilizaron galerías API 20 E, también agares Cromogénicos como agar Salmonella y agar CPS ID3, para pruebas complementarias como la prueba de oxidación y fermentación de glucosa, placas para la prueba de oxidasa y H₂O₂ para la prueba de catalasa (CASTILLO, et al., 2009, p. 2)

Se realizó los métodos de muestreo según las normas oficiales mexicanas, en la planta de Alseseca Sur (descargas de agua residual municipal e industrial) se realizó 2 muestreos y 1 muestreo en la planta del Parque Ecológico (descarga de agua residual municipal), terminado el muestreo en 2 horas se realizó la siembra en los 7 medios por el método de dilución en placa, incubándose durante 3 días a 30°C, se realizó el aislamiento al 3° día del conteo. (ASHBOT, 2003, p. 150).

Luego se efectuaron pruebas complementarias para la identificación de las cepas: siembra en agar Mac Conkey, agar Soya Trypticasa, agar Cromogénico CPS ID3, agar Sulfito de Bismuto que sirve para identificación de Salmonella, Chromagar Salmonella que da coloraciones malva o azul para posibles enterobacterias, la prueba de Oxidación y Fermentación de glucosa (prueba O/F), la prueba de oxidasa y catalasa. Antes de realizar la identificación se llevaron a cabo pruebas para comprobar la multiresistencia en las bacterias aisladas, esto mediante la siembra de las mismas en 4 medios con antibióticos diferentes Km, Ap, Cm Tc., a las más resistentes.

En las coloraciones azul, rosa, o verde en el agar CPS ID3, coloraciones azul o verde en Chromagar Salmonella, coloración negra en agar sulfito de Bismuto, se realizaron las pruebas de identificación en las galerías API 20E según las instrucciones del fabricante (Biomerieux), contienen 20 micro tubos, cada uno con una prueba bioquímica diferente, dejándose en incubación por 1 día a 30 y después registrándose las lecturas. (CASTILLO, et al., 2009, p. 28).

En los métodos realizados por Armando Martínez, Lázaro Lima, María Elena Carballo, Mario Cruz, Susana Olivares, Irina Salgado, Oiris Veranes y Danae Rodríguez sobre “Resistencia a antibióticos y a metales pesados en bacterias aisladas del río Almendares”. La recolección de las muestras se hizo en frascos plásticos estériles de 2L, en 3 puntos el sedimento del río Almendares, corriente fluvial receptora de residuos no tratados o con tratamientos deficientes, fueron escogidas por la cercanía de posibles fuentes contaminantes, luego se trasladaron al laboratorio y se procesaron de inmediato. (MARTÍNEZ, et al., 2010, pp. 1-2).

En solución fisiológica se prepararon diluciones seriadas desde 10⁻¹ a 10⁻² de las muestras; luego se sembraron por dispersión 100 µL en Agar Nutriente por tres repeticiones y se incubaron durante 24 horas a 30 ± 2° C. De los aislados obtenidos se comprobó la pureza y según el Manual de Bergey's se identificaron taxonómicamente por pruebas fisiológicas, morfológicas y bioquímicas. (MARTÍNEZ, et al., 2010, pp. 6-7).

Se utilizó el método de Kirby-Bauer para determinar de la resistencia bacteriana a antibióticos. Se cultivó en Caldo Nutriente cada microorganismo y se incubó por 24 h a 37°C, luego la concentración celular se ajustó a 0,5 de la densidad del estándar Mac Farland. Con la ayuda de hisopos estériles las suspensiones bacterianas se inocularon en placas con Agar Nutriente. Posteriormente se colocaron los discos de antibióticos Amikacina (AMIK), Cefalexina (CEF), cefotaxima (CTX), kanamicina (KAM), cloranfenicol (CLOR), ceftriaxona (CRO) a concentración de 30 µg y eritromicina (ERI), penicilina (PEN) y norfloxacina (NOR) a la concentración de 10 µg sobre el medio de cultivo inoculado y se incubaron durante 24 h a 37°C. (MARTÍNEZ, et al., 2010, pp. 6-7)

CAPÍTULO II

2 MARCO METODOLÓGICO

2.1 Lugar de la investigación

La investigación se llevó a cabo en la ciudad de Riobamba, provincia de Chimborazo, cuyo trabajo fue de tipo Investigativo, se realizaron los análisis microbiológicos en el laboratorio de Microbiología de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH), Facultad de Ciencias, de la Escuela de Bioquímica y Farmacia, donde se evaluó la susceptibilidad microbiológica de bacterias aisladas del agua de consumo, en un tiempo determinado (julio-septiembre del 2015) las mismas que se obtuvieron de diferentes puntos de la ciudad.

2.2 Unidad de análisis

Fue el agua de consumo, el agua potable recolectada de diferentes casas (grifos) y de botellas envasada de agua mineral natural de venta en la ciudad de Riobamba.

2.3 Población de estudio

La población corresponde al agua potable de las diferentes redes de distribución y el agua envasada de consumo en la ciudad de Riobamba, provincia de Chimborazo.

Tabla 3-2: Redes de distribución de la ciudad de Riobamba

Ubicación	Red distribución
Sta Ana, El Tambo, Buenos Aires, Urdaneza Norte, hasta calle Pafanes	Red Tratamiento
Acacias, parte de Tierra Nueva, hasta Av. La Prensa, redondel de Tapi	Red Carmen
Cisneros de Tapi, San José de Tapi, el Rosario, parte de las Acacias y 24 de Mayo	Red San José de Tapi
Calle Larrea, baja la calle del subcentro, Madrid, Politécnica, Sta Faz, San Alfonso, Las Flores	Red Maldonado
Av La Vasija, vía a Baños, abajo gasolinera Bonanza, Picin, Florecel	Red San Martín de Veranillo
Desde la Gasolinera Bonanza, Troje 1 y 2, La Alborada	Red Picin
Parte del barrio 24 de Mayo, Juan Montalvo, Gruta del Norte	Red el Recreo
Av, La Prensa, baja por Macají, La Primavera, Puente Yaruqui, calle Larrea, Cerámica, los Pinos Cordobés, Dávalos	Red Saboya
Todo Yaruquies hasta el puente de Yaruquies	Red Yaruquies

Realizado por: Erika Vargas, 2015

2.4 Tamaño de la muestra

Las muestras fueron 11, de las cuales 6 muestras fueron de agua potable (grifo) aproximadamente unos 250 cc, asegurándose que el agua tomada llegue directamente de la red de distribución y no venga de la cisterna y 5 muestras de las botellas plásticas de agua envasada.

Tabla 4-2: Sitios de recolección de las muestras de agua de grifo

Número	Lugar	Red de distribución
1	Eloy Alfaro entre 10 de Agosto y Guayaquil (Barrio La Dolorosa)	Red Maldonado
2	Vía Penipe Av. Alfonso Chavez (Barrio José Mancero)	Red San Martín de Veranillo
3	Av. 9 de Octubre y Vargas Torres (Barrio La Prensa)	Red Saboya
4	Panamericana Norte Km 2 ¹ / ₂ (Sector Santa Ana)	Red Tratamiento
5	Rafael Ferrer y Juan Romualdo (Ciudadela Juan Montalvo)	Red el Recreo
6	Laboratorio Clínico de la ESPOCH	Red el Recreo

Realizado por: Erika Vargas, 2015

Tabla 5-2: Recolección de muestras de agua mineral natural embotellada.

Número	Procedencia	Nombre comercial
1	Agua Natural de Machachi	Agua Tradicional
2	Agua de Macuchi-Pilaló	H ₂ O Vida, agua de vertiente natural
3	Estero Hondo Km 5 ¹ / ₂ vía La Maná	Splendor
4	Machachi-Cotopaxi	Tesalia
5	Lesbains-Francia	Evian

Realizado por: Erika Vargas, 2015

2.5 Selección de la muestra

Antonio Guevara (1996), describe que en la selección de la muestra se debe seleccionar el muestreo en los grifos ubicados entre el punto de incorporación del suscriptor a la red y un punto en la red doméstica para realizar el análisis bacteriológico y el control de la calidad del agua servida a poblaciones. En esta investigación solo se realizó en un solo punto de la

vivienda, el cual fue del grifo por donde llega el agua directamente de la red de distribución y se descartó el punto de la red doméstica ya que en la ciudad de Riobamba es muy común la utilización de cisternas o tanques reservorios los cuales no tienen una limpieza continua y adecuada, siendo un lugar idóneo para el desarrollo bacteriano, por lo tanto no se verificaría la calidad del proceso del tratamiento del agua potable.

Se realizó la captación y el transporte de las muestras de agua para el análisis microbiológico adoptando todas las precauciones con la finalidad de asegurarse que la muestra de agua sea representativa y evitar la contaminación de la misma durante el proceso de muestreo. (GUEVARA, 1996, <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/scan2/031279/031279.pdf>)

2.5.1 Técnica de captación en grifos y transporte de muestras.

Captación de la muestra en un grifo

En la captación de muestras en un grifo el procedimiento fue el siguiente, se abrió la llave del grifo por cinco minutos y luego se cerró; se procedió a esterilizar la boca del grifo con alcohol. Después de regular el flujo, se inició la captación de la muestra retirando el tapón y colocando en envase de plástico donde sale el agua, hasta que la misma se haya llenado las tres cuartas partes, se tapó y se colocó en el coolers, estos envases de plástico donde se recolectó la muestra deben estar previamente codificados. (GUEVARA, 1996, <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/scan2/031279/031279.pdf>)

Guevara indica que se debe utilizar botellas de vidrio neutro con tapa de vidrio esmerilado o de baquelita de capacidad 120mL especialmente destinadas para este fin y previamente esterilizadas. Los envases no deben destaparse sino hasta el momento mismo del muestreo y debe evitarse que el agua toque algún objeto mientras pase el punto de captación a la botella. (GUEVARA, 1996, <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/scan2/031279/031279.pdf>). Al no disponer de estos recipientes se optó por utilizar los envases de plástico que se emplea para la recolección de la orina, disponibles en cualquier farmacia.

Los envases que se utilicen para el muestreo de agua potable, debe contener, antes de ser esterilizados, una concentración suficiente de tiosulfato de sodio (0,1 mL de una solución al 10% de tiosulfato de sodio por cada 100 mL de agua) con el fin de neutralizar el cloro residual que puede estar presente en la muestra e impedir de esta manera, que continúe ejerciendo su acción bacteriológica y disminuya o elimine la oportunidad de detectar los microorganismos

que podrían indicar una posible contaminación del agua. (GUEVARA, 1996, <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/scan2/031279/031279.pdf>).

Transporte de las muestras

Guevara sugiere que al transportar las muestras estas sean colocadas en cavas o recipientes adecuados llenos de hielo y con una bolsa plástica adjunta; en ningún caso debe colocarse el hielo y los envases que contienen las muestras en forma simultánea, ya que al derretirse el hielo puede ocurrir contaminación de estas últimas. En este caso se utilizó coolers y se realizaron los análisis microbiológicos antes de 24 horas.

2.5.2 Registro de las muestras.

Después de captadas las muestras deben ser registradas e identificadas apropiadamente para lo cual se colocaron en las botellas o envases una etiqueta, basándose en la Norma NTE INEN 2176: 2013, denominada “Agua. Calidad del Agua. Muestreo”, en la sección sobre las Técnicas de Identificación y Registros de muestreo donde menciona que debe incluirse al menos los siguientes datos en el informe de muestreo:

- a) localización (y nombre) del sitio del muestreo, con coordenadas (lagos y ríos) y cualquier información relevante de la localización;
- b) referencias del punto de muestreo;
- c) nombre del recolector;
- d) hora de la recolección;
- e) método de recolección;
- f) fecha de la recolección;
- g) datos recogidos en el campo
- h) condiciones atmosféricas. (NTE INEN, 2013, p. 10).

Además de estos datos Antonio Guevara sugiere que en las etiquetas sean registradas con los siguientes datos: Nombre de la persona que captó la muestra, fecha, hora y ubicación exacta del sitio de muestreo, temperatura del agua, detalles de cualquier tratamiento aplicado al agua, condiciones del tiempo, gasto de la fuente, etc. GUEVARA, 1996, <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/scan2/031279/031279.pdf>).

Tabla 6-2: Codificación y registro de las muestras

	Código	Lugar	Red de distribución	Fecha de recolección	Hora de recolección
Muestras de Agua Potable	1	Eloy Alfaro entre 10 de Agosto y Guayaquil (Barrio La Dolorosa)	Red Maldonado	2015-07-23	14:53 pm
	2	Vía Penipe Av. Alfonso Chávez (Barrio José Mancero)	Red San Martín de Veranillo	2015-07-23	15:59 pm
	3	Av. 9 de Octubre y Vargas Torres (Barrio La Prensa)	Red Saboya	2015-07-23	15:29 pm
	4	Panamericana Norte Km 2 ¹ / ₂ (Sector Santa Ana)	Red Tratamiento	2015-07-23	16:52 pm
	5	Rafael Ferrer y Juan Romualdo (Ciudadela Juan Montalvo)	Red el Recreo	2015-07-23	17:40 pm
	11	Laboratorio Clínico de la ESPOCH	Red el Recreo	2015-07-23	18:30 pm
	Código	Procedencia	Nombre comercial	Contenido Neto	Hora y fecha de recolección
Muestras de Agua	6	Agua Natural de Machachi	Agua Tradicional	5000 mL	19:00 pm / 2015-07-23
	7	Agua de Macuchi-Pilaló	H ₂ O Vida	20 L	8:30 am / 2015-07-24
	8	Estero Hondo Km 5 ¹ / ₂ vía La Maná	Splendor	500 mL	19:00 pm / 2015-07-23
	10	Machachi-Cotopaxi	Tesalia	250 mL	19:00 pm / 2015-07-23
	9	Lesbains-Francia	Evian	500 mL	19:00 pm / 2015-07-23

Realizado por: Erika Vargas, 2015

2.6 Siembra de las muestras en los medios de cultivo

2.6.1 Siembra en Agar Cetrimide

Este es un medio utilizado para el aislamiento de *Pseudomonas* que favorece la pigmentación de *Pseudomonas aeruginosa*.

Fórmula en g/L de agua destilada:

- Peptona de gelatina: 20g
- Cloruro de magnesio: 1,4 g
- Fosfato de potasio: 10 g
- Cetrimida: 0,3 g
- Agar: 13,6 g
- pH: 7,2

Las distintas fórmulas comercializadas difieren en la concentración de Cetrimide y en la incorporación o no de ácido nalidíxico. (ALBAREZ, et al., 1995, p. 31). El medio de cultivo del Agar Base Cetrimide Selectivo fue de la casa comercial Hardy Diagnostics.

Para la preparación del medio se verificó las instrucciones, donde indica que se necesita 45,3 gramos para 1 litro de agua destilada, además de la adición de 10 mililitros de glicerina. Se preparó 500 mililitros para aproximadamente unas 20 a 23 placas Petri.

45,3g → 1 L (1000 mL)
X → 500 mL = 22,65 g de Agar Cetrimide + 5 mL de glicerina.

Se pesó esta cantidad y se mezcló con los 500 mililitros de agua destilada, para disolver el agar se calentó en el reverbero hasta que hierva por tres veces y se adicionó los 5 mililitros de glicerina agitando constantemente, luego se esterilizó en autoclave a 121 psi por 15 minutos.

Transcurrido este tiempo se sacó del autoclave y se deja que enfríe hasta que la palma de la mano aguante la temperatura del medio y luego se reparte en las placas, evitando que se formen burbujas de aire, en el caso de formarse, con el asa de platino esterilizada por el fuego hasta rojo incandescente se pincha la burbuja antes que el medio se solidifique. Una vez solidificado se guarda en la refrigeradora a 4°C.

Para sembrar en las placas de Cetrimide estas deben estar a temperatura ambiente, se codifica cada una al momento de sembrar, la técnica utilizada fue la siembra en placa por extensión, ya que es una forma directa y fácil de conseguir colonias aisladas.

2.6.1.1 Método de siembra en placa por extensión

Se tomó 0,1 mililitros de la muestra con ayuda de la pipeta de 100 µL y con una punta amarilla previamente esterilizada se colocó dicha cantidad en el centro de la placa con agar. Se introdujo una varilla acodada de vidrio (rastrillo) en un vaso con alcohol. Luego esta varilla se esterilizó a la llama y se deja enfriar. Se extiende la muestra uniformemente con la varilla sobre toda la superficie de agar mientras se va girando la placa con la otra mano, este procedimiento se realiza para cada una de las muestras. Finalmente se incuban las placas en la estufa a 35°C durante veinticuatro- cuarenta y ocho horas.

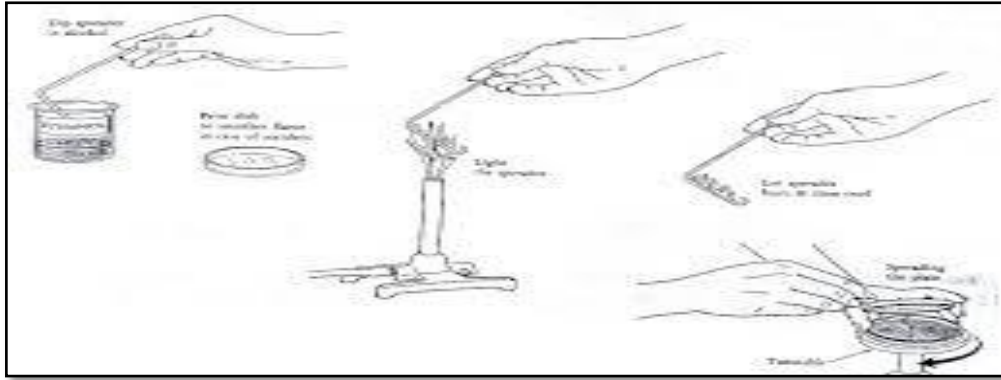


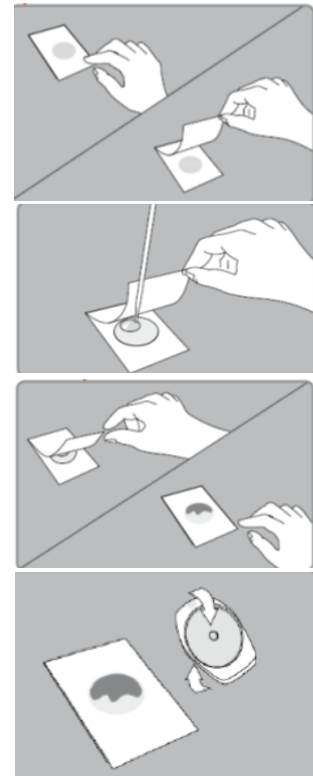
Figura 8-2: Técnica de siembra en placa por extensión.
Fuente: (LANSING, et al., 2002, p. 112)

2.6.2 Siembra en placas con película secas rehidratables Petrifilm

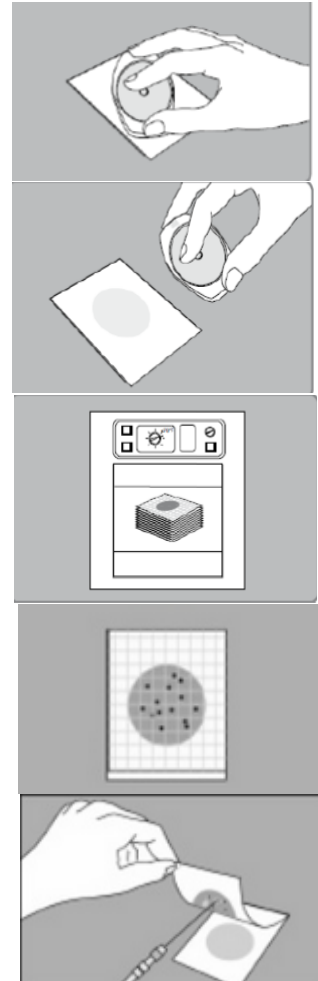
Las placas Petrifilm™ para recuento de Aerobios Totales (Aerobic Count AC) son un medio de cultivo listo para ser empleado, que contiene nutrientes del Agar Standard Methods, un agente gelificante soluble en agua fría y un tinte indicador de color rojo que facilita el recuento de las colonias. Las placas Petrifilm AC se utilizan para el recuento de la población total existente de bacterias aerobias en productos, superficies, etc. (MICROBIOLOGY Products, 2004, p. 3).

Se utilizaron placa Petrifilm AC para mesófilos aerobios y se prosiguió con la técnica que se describe para este tipo de placas la cual fue de la siguiente manera:

- Disponer de la placa Petrifilm en una superficie plana. Codificarla y levantar el film superior.
- Pipetear 1 mL de muestra, aproximadamente al centro del film interior, sin tocar el film inferior. Mantener la pipeta en posición vertical.
- Soltar el film superior y dejarlo caer, evitando la formación de burbujas. No deslizar el film hacia abajo.
- Colocar el dispensor o espaciador con el lado que posee un borde hacia abajo (cara lisa hacia arriba), sobre el film superior transparente, el dispensor o espaciador debe estar bien centrada y cubrir totalmente el inóculo.



- Presionar suavemente sobre el dispersor o espaciador para distribuir el inóculo sobre el área circular. No mover ni girar el dispersor
- Levantar el dispersor o espaciador. Esperar por lo menos 1 minuto que se solidifique el gel.
- Incubar las placas Petrifilm cara arriba y apiladas en grupos de no más de 20. Para aerobios mesófilos se incuba a 30°C durante 72 horas.
- Leer las placas para la respectiva interpretación y expresar los resultados de los contajes en placas como unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL).
- Las colonias pueden ser aisladas para su identificación posterior. Levantar la película superior y recoger la colonia del gel. (MICROBIOLOGY Products, 2004, pp. 1-2).



2.7 Cuantificación de las bacterias heterótrofas aerobias mesófilas.

En el medio Cetrímide transcurrido dos días y hasta una semana no hubo crecimiento en ninguna de las muestras.

En las placas de Petrifilm transcurridas las veinticuatro horas existió crecimiento de algunas muestras y después de cuarenta y ocho existió crecimiento en otras muestras. Para su cuantificación se realizó las siguientes consideraciones:

- Puede ser contada toda la placa petrifilm AC o por cuadrante.
- El tinte indicador rojo que se encuentra en la placa Petrifilm AC colorea las colonias para su mejor identificación. Se cuenta todas las colonias rojas sin importar su tamaño o la intensidad del tono rojo.
- El rango recomendado de conteo en la Placa Petrifilm AC esta entre 25- 250 colonias.
- Cuando el número de colonias es mayor a 250, por su excesivo crecimiento, los conteos deben ser estimados. Determinar el promedio de las colonias en un cuadrado (1cm²) y

multiplicar por 20 para obtener el conteo total por placa. El área de inoculación de Petrifilm AC es de 20 cm².

- Aquellas placas que tengas más de 300 colonias se reportan como “Incontables”, ya que existen colonias muy numerosas para contar, es decir son recuentos muy altos, toda el área de crecimiento puede virar al rosa. (MICROBIOLOGY Products, 2004, pp. 3-5).

2.8 Aislamiento y purificación de las colonias de bacterias heterótrofas aerobias mesófilas.

Para realizar la identificación bacteriológica se necesitó de un cultivo puro, es decir, una población de células que proceden de una única célula, para caracterizar una especie individual. Por lo tanto, de las placas de Petrifilm donde existió crecimiento, se inició la preparación de cultivos puros, aplicando la técnica de siembra en estrías.

Se procedió de la siguiente manera, se abrió el film superior y con el asa de platino fría, después de haber esterilizado por el fuego hasta rojo incandescente se identificó las colonias diferentes, y se recogió con el asa unas dos colonias visiblemente semejantes y se procedió a inocular la mezcla microbiana sobre un extremo de la placa con agar nutritivo, y se extendió formando estrías sobre la superficie en tres sentidos, este procedimiento se realizó de cada una de las muestras codificando estas placas en relación al código que se le dio en el petrifilm.

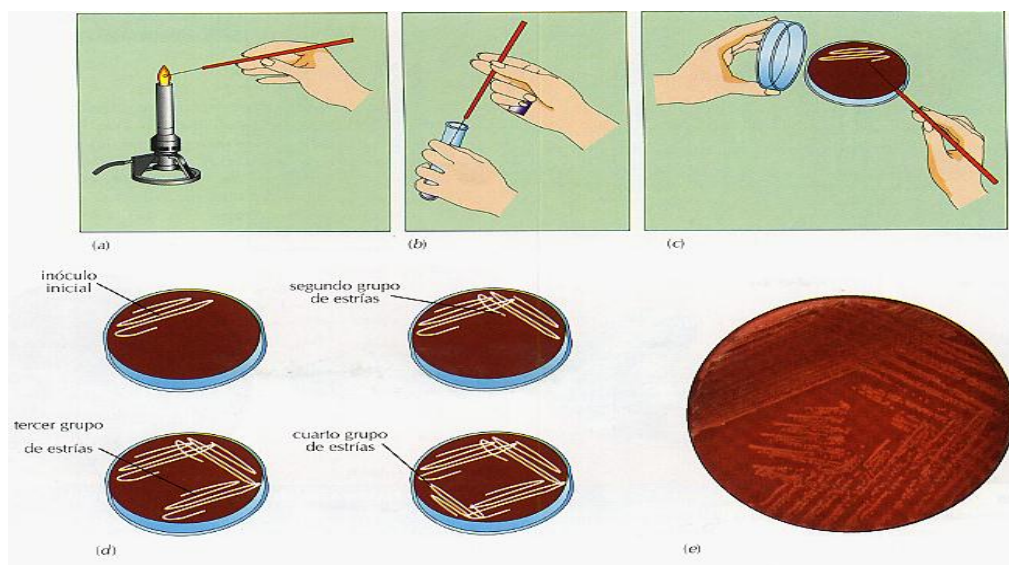


Figura 9-2: Técnica de siembra en estrías
Fuente: (LANSING, et al., 2002, p. 113)

Terminado este procedimiento se obtuvo 23 cajas, las cuales se apilaron en grupos de 6 cajas y se incubaron en la estufa a 35°C durante veinte y cuatro a cuarenta y ocho horas.

2.8.1 Preparación del Agar Nutritivo

Este es un medio utilizado para el cultivo de una amplia variedad de microorganismos. El agar Nutritivo se encuentra descrito en los Métodos Estándar de la APHA (American Public Health Association) y de la AOAC (Association of Oficial Analytical Chemists) para el análisis de agua, leche y sus derivados, alimentos y otros materiales. En este medio el extracto de carne y la peptona aportan la fuente de nitrógeno, vitaminas y carbono.

Fórmula en g/L de agua destilada:

- Extracto de carne: 3.0 g
- Peptona: 5.0g
- Agar: 15g
- pH: $6,8 \pm 0,2$

Para la preparación del medio se verificó las instrucciones, donde se indicó que se necesita 23g para 1 L de agua destilada. Se preparó 500mL para aproximadamente unas 20 a 23 placas Petri.

$$\begin{array}{l} 23 \text{ g} \longrightarrow 1 \text{ L (1000 mL)} \\ X \longrightarrow 500 \text{ mL} \qquad = 11,5 \text{ g de Agar Nutritivo.} \end{array}$$

Se pesó esta cantidad y se mezcló con los 500 mL de agua destilada, para disolver el agar se calentó en el reverbero hasta que hierva por tres veces agitando constantemente, luego se esterilizó en autoclave a 121 psi por 15 minutos. Transcurrido este tiempo se saca del autoclave y se deja que enfríe hasta que la palma de la mano aguante la temperatura del medio y luego se reparte en las placas, evitando que se formen burbujas de aire, en el caso que se formen con el asa de platino esterilizada por el fuego hasta rojo incandescente se pincha la burbuja antes que el medio se solidifique. Una vez solidificado se guarda en la refrigeradora a 4°C.

2.8.2 Purificación de las colonias aisladas

Luego del aislamiento en el agar Nutritivo, se procedió a aislar y purificar las colonias que tengan forma, color y tamaño semejante, mediante la técnica de siembra por estrías por agotamiento en cuadrantes, con este procedimiento se pudo conseguir una buena separación de las colonias para luego aislarlas fácilmente.

Para esta técnica se seleccionó la colonia de una muestra, se tomó con el asa de platino previamente esterilizada y se inoculó sobre la superficie del medio en un extremo de la placa

con agar nutritivo estriando hacia el centro, luego se fue girando la placa y en cada extremo se continuo estriando hacia el centro, hasta completar la placa, de esta manera las colonias de las células individuales se van despendiendo del asa al frotarla sobre la superficie en varias ocasiones, con lo cual se logró un desarrollo de colonias aisladas en el agar nutritivo. Este procedimiento se realizó de cada placa de las muestras y codificando simultáneamente.

Una vez terminado este procedimiento se obtuvieron un total de 28 cajas, las cuales se apilaron en grupos de 6 placas, y se incubaron en la estufa a 35°C durante veinte y cuatro horas.

Transcurrido este tiempo se observó mayor densidad de crecimiento al inicio del agotamiento sin poder diferenciar colonias, sin embargo, al final de éste las colonias están mejor aisladas y se aprecian las diferencias entre ellas como en el tamaño, color y forma, luego se aislaron (repique) en agar Nutritivo, seleccionando las colonias que presenten diferencia significativa, una vez seleccionada se cogió una colonia con el asa de platino previamente esterilizada y se estrío en el agar, para saber el tipo de colonias que se seleccionó se colocó una numeración en cada colonia ubicando a la vez su posición en cada caja, este procedimiento se realizó de todas las colonias diferentes de cada una de las muestras.

Terminado este procedimiento resultaron un total de 31 colonias las cuales se incuban en la estufa a 35°C durante veinte y cuatro horas.

2.9 Caracterización macroscópica y microscópica de los aislados bacterianos encontrados.

Para realizar cualquier método microbiológico se utilizaron colonias de veinte y cuatro horas.

2.9.1 Caracterización macroscópica

Una de las características principales de las bacterias es su apariencia (características de desarrollo) seguida del crecimiento en diferentes medios de cultivo. Estas características generales como el color (o cromogénesis), abundancia de crecimiento y aun el olor del cultivo pueden servir de guías para la identificación.

Después de la siembra durante el aislamiento y purificación de las colonias en el medio de cultivo (agar nutritivo) y después de la incubación, se pueden determinar las características de cultivo del microorganismo. Los aspectos más peculiares de desarrollo en cada uno de los medios se resumen de la siguiente manera:

Tamaño: Los límites del tamaño de las colonias varían desde muy pequeñas (punta de alfiler), que miden solamente unas fracciones de milímetros de diámetro, hasta colonias muy grandes que miden desde 5 o 10 milímetros de diámetro. La mayoría de las bacterias forman colonias de tamaños limitados de acuerdo con el período de incubación.

Margen o borde: Los bordes de las colonias bacterianas son de diferentes tipos, según la especie de que se trate. Pueden formar un círculo perfecto, como las orillas de una gota, o mostrar gran variedad de irregularidades como salientes redondos, hendiduras irregulares, proyecciones filiformes, o proyecciones en forma de raíz.

Elevaciones: Las colonias pueden ser muy finas (aplanadas) o gruesas (elevadas). Las colonias elevadas muestran diferentes grados de convexidad.

Cromogénesis o pigmentación: Las colonias pueden estar coloreadas (pigmentadas) o sin color (no pigmentadas). Algunas especies se caracterizan por los matices que presentan de rojo, amarillo, café y violeta.

Características ópticas: Existen bacterias que pueden ser opacas, transparentes u opalescentes. (PELCZAR, et al., 1982, pp. 125-127).

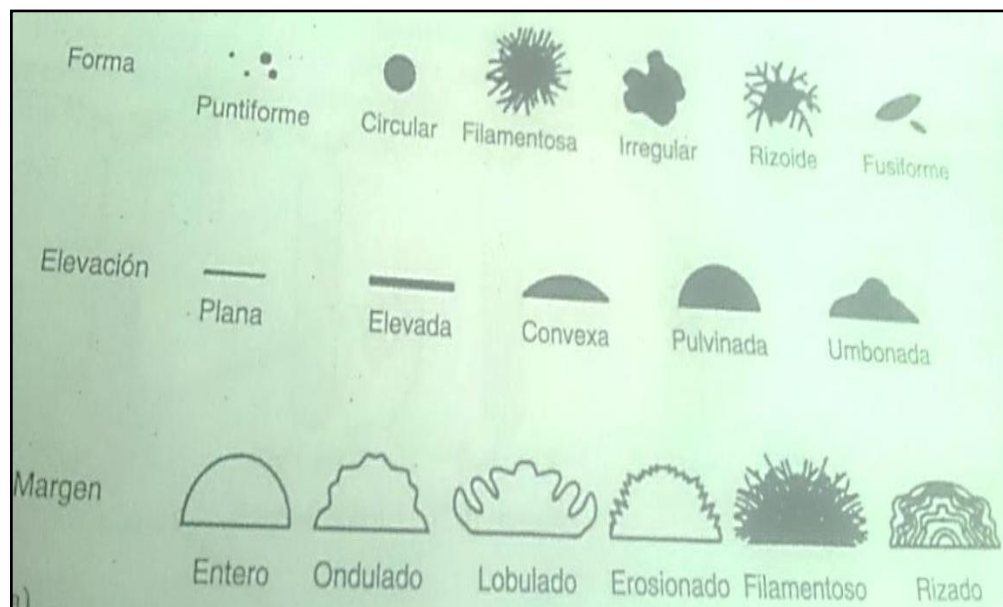


Figura 10-2: Morfología de las colonias

Fuente: (LANSING, et al., 2002, p. 114)

2.9.2 *Caracterización microscópica*

2.9.2.1 *Tinción de GRAM*

Esta técnica fue desarrollada por el médico danés Christian Gram en 1884, es un método de coloración diferencial más utilizada en microbiología, ya que diferencia a las bacterias en dos grandes grupos según sus propiedades de tinción, es decir, según retengan o no el cristal violeta utilizado en la tinción: grampositivas y gramnegativas.

Prácticamente todos los autores están de acuerdo en utilizar esta tinción como primer paso en identificación bacteriana. Esta prueba tiene una importancia capital, pues una incorrecta interpretación puede hacer variar bastante el número de pruebas bioquímicas a efectuar, y alejarnos considerablemente de la verdadera identificación.

Reactivos:

- Violeta de genciana fenicado:
 - Violeta de genciana: 1g
 - Ácido fénico: 25g
 - Alcohol absoluto: 10mL
 - Agua destilada: 100 ml

- Solución de lugol (mordiente)
 - Yodo: 1g
 - Yoduro potásico: 2g
 - Agua destilada: 300 mL

- Decolorante:
 - Alcohol de 96°: 70mL
 - Acetona: 30mL

- Se utilizó como decolorante de contraste safranina:
 - Safranina (2,5g/100mL alcohol 95°): 10mL
 - Agua destilada: 90mL

Técnica:

- Codificar la placa en la parte de atrás.

- Extender una colonia, secar y fijar al calor.
- Cubrir la preparación con violeta de genciana y dejar actuar un minuto.
- Lavar con agua.
- Cubrir la preparación con lugol, y dejar actuar un minuto.
- Lavar con agua
- Decolorar con alcohol-acetona hasta que se arrastre todo el colorante durante 30 segundos, si continúan el colorante lavar y colocar por 30 segundos más.
- Lavar con agua
- Cubrir la preparación con safranina, y dejar actuar de un minuto.
- Lavar con agua.
- Secar a temperatura ambiente y observar con objetivo de inmersión.

Las bacterias grampositivas se observan de color violeta, ya que retienen el cristal violeta y las gramnegativas pierden el cristal violeta y por el contraste de la safranina aparecen de color rosa, siendo de tonalidad más tenue al utilizar safranina como colorante de contraste.

NOTA: En otros países se utiliza pautas que difieren algo en cuanto al tiempo de aplicación de los colorantes. También hay autores que prefieren ahorrarse el lavado con agua después de haber puesto el primer colorante, verificando la operación de arrastre directamente con el lugol. (ALBAREZ, et al., 1995, p. 24).

En la siguiente tabla se señalan los pasos y los resultados en cada etapa del procedimiento. ¿Por qué con este procedimiento se tiñen algunas bacterias de púrpura violeta y otras roja? La respuesta está en las diferencias de sus estructuras químicas de superficie.

Tabla 7-2: Coloración de Gram

Soluciones aplicadas por su orden	Reacción y apariencia de las bacterias	
	Grampositivas	Gramnegativas
Cristal violeta	Las bacterias se tiñen en violeta	Las bacterias se tiñen en violeta
Solución yodo yodurada (I) (Lugol)	Complejo CV-I se forma dentro de las bacterias; las bacterias permanecen violeta	Complejo CV-I se forma dentro de las bacterias; las bacterias permanecen violeta
Alcohol	Las paredes celulares se deshidratan, hay retracción de los poros, la permeabilidad disminuye, el complejo CV-I no puede salir de la bacteria, permanecen violeta	Extracción de lípidos de las paredes celulares, aumento de porosidad, CV-I sale de la bacteria.
Safranina	Las bacterias no afectadas permanecen violeta	Las bacterias toman este colorante y se tiñen de rojo

Fuente: (PELCAZAR, et al., 1982)

2.10 Identificar taxonómicamente los microorganismos aislados.

Para realizar cualquier método microbiológico se utilizan colonias de veinte y cuatro horas.

Se realizó para las 31 colonias aisladas las siguientes pruebas microbiológicas:

2.10.1 Prueba de la catalasa

La catalasa es una enzima propia de la mayoría de las bacterias aerobias facultativas que poseen citocromos, con la excepción de *Streptococcus*. Su función es descomponer el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), desprendiendo oxígeno libre.

La prueba se puede realizar en un porta o directamente sobre el cultivo.

Al realizar esta prueba, en el caso de tener placas que se han incubado en anaerobiosis deben permanecer expuestas al aire durante treinta minutos, por lo menos, antes de iniciar la prueba.

Reactivo.

Agua oxigenada al 3 por 100. Se utilizó la marca Ecuaquímica.

Método

Se tomó con un palillo esterilizado o también se puede utilizar el asa de platino una colonia de veinte y cuatro horas y se depositó sobre el porta objetos. Se añadió con una pipeta una gota de agua oxigenada al 3 por 100; si se utiliza el asa de platino lo que no debe hacerse es homogenizar el asa con el cultivo sobre una gota de H_2O_2 depositado previamente en el porta, pues produce falsos positivos.

Esta prueba puede realizarse también añadiendo el agua oxigenada directamente sobre una placa que contiene un cultivo puro.

Hay que tener en cuenta que si la colonia procede de una placa de agar sangre puede dar falsos positivos debido a la presencia de eritrocitos, que también poseen catalasa. No existe dicha posibilidad si procede de otro medio de cultivo, incluido el agar chocolate.

Interpretación de los resultados

Se considera la prueba positiva cuando se observa desprendimiento de burbujas de gas (O₂). (ALBAREZ, et al., 1995, pp. 115-116).

2.10.2 Prueba de la oxidasa

Pone de manifiesto la presencia de la enzima oxidasa en ciertos microorganismos. La oxidasa o citocromo-oxidasa es una enzima que cede electrones (H₂), de un sustrato al oxígeno, en el tren de transporte electrónico.

Reactivo

Pueden utilizarse diversos reactivos, que son colorantes que actúan como aceptores de electrones, pasando en este caso de forma incolora o poco coloreada, a fuertemente teñida.

El reactivo más utilizado es el clorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina al 1 por 100 en agua (Reactivo de Kovacs).

Existen comercializados discos o tiras de papel impregnadas de reactivos para el diagnóstico de oxidasa, para esta investigación se utilizó las tiras de oxidasa de la marca Hardy Diagnostics – OXIS TRIP.

Método

No se debe utilizar el asa de platino de hierro ya que puede dar falsos positivos, por este motivo se utilizó palillos previamente esterilizados, con los cuales se cogió una colonia de veinticuatro horas y se extendió sobre la tira de papel de oxidasa.

Interpretación de los resultados

La aparición de una coloración púrpura sobre el sitio de inoculación se considera como reacción positiva. Si no hay cambio de coloración, la prueba es negativa. (ALBAREZ, et al., 1995, pp. 134-135).

Las siguientes pruebas se realizan solo para las colonias identificadas mediante la tinción GRAM como cocos Gram positivos, además de haber seleccionado 6 colonias.

2.10.3 Prueba de la coagulasa

Consiste en poner de manifiesto la enzima coagulasa que poseen algunos *Staphylococcus aureus* son considerados patógenos. Actualmente se sabe que hay *Staphylococcus coagulasa* negativos, virulentos y productores de cuadros clínicos, como endocarditis o infecciones urinarias.

Medio de cultivo

La prueba puede hacerse partiendo directamente de una colonia obtenida de una placa de aislamiento, pero es mejor utilizar un crecimiento de dieciocho a veinticuatro horas obtenido en algún medio líquido enriquecido, como la infusión de cerebro-corazón (BHI).

Reactivo

Se utiliza plasma humano o de conejo. Debido a la facilidad con la que todos los laboratorios disponen de plasma humano, se recomienda la utilización de este último, conseguido de la siguiente manera:

- Recoger sangre humana obtenida en condiciones asépticas, e incluirla en un tubo estéril que contenga anticoagulante (citrato sódico, EDTA o heparina).
- Dejar que los glóbulos rojos sedimenten por sí solos, o, si se tiene prisa, centrifugar a pocas revoluciones.
- Con una pipeta estéril aspirar el sobrenadante, que se pasará a un tubo, también estéril, y se guardará en nevera a 4°C.

Método

Se puede seguir dos tipos de técnicas:

- La prueba del portaobjetos, que pone de manifiesto la coagulasa ligada.

Depositar una gota de agua destilada estéril sobre un porta. Homogenizar sobre ella una gota de suspensión bacteriana de veinticuatro horas. Añadir una gota de plasma junto al homogenizado anterior y mezclar bien.

- La prueba del tubo de hemólisis, que pone de manifiesto la coagulasa ligada y la coagulasa libre.

Depositar 0,5 mL de plasma dentro de un tubo de hemólisis y añadirle 0,5 mL de un cultivo del germen. Mezclar suavemente por rotación del tubo, sin agitar incubar a 37°C, preferiblemente en un baño de agua, observando el tubo cada treinta minutos, hasta las cuatro horas. Esta técnica fue la realizada en esta investigación.

Interpretación de los resultados

En la prueba del portaobjetos la reacción positiva se observa entre los quince y veinte segundos con formación de abundantes grumos de color blanco. Se considera negativa la prueba, si no hay aglutinación en tres o cuatro minutos.

En el caso del tubo de hemolisis se considera como prueba positiva la formación de un coagulo, que se manifiesta al inclinar con cuidado el tubo. Los tubos se leen hasta las cuatro horas, pero no se da resultado como negativo (ausencia de coagulo) hasta transcurridas veinticuatro horas. Algunos microorganismos que utilizan citrato pueden dar reacciones falsamente positivas cuando se usa dicho anticoagulante. (ALBAREZ, et al., 1995, pp. 117-118).

2.10.4 Preparación del caldo cerebro-corazón

El caldo cerebro corazón (BHI) es un medio líquido, especialmente adaptado para el crecimiento de microorganismos exigentes. Es un excelente caldo para hemocultivo. Se utilizó el caldo cerebro corazón de la casa comercial Merck KGaA, Alemania.

Fórmula en g/L de agua destilada:

- Infusión de cerebro de ternera: 20g
- Infusión de corazón de buey: 25g
- Peptona de gelatina: 10g
- Cloruro sódico: 5g
- hidrógenofosfato disódico: 2,5g
- D(+)-Glucosa: 2g
- pH: 7,4 (ALBAREZ, et al., 1995, p. 31)

Para la preparación del medio se verificó las instrucciones, donde se indicó que se necesita 37 gramos para 1 Litro de agua destilada. Se preparó 50 mililitros para aproximadamente unos 10 - 11 tubos con cerca de 4 a 5 mililitros.

$$\begin{array}{l} 37 \text{ g} \longrightarrow 1 \text{ L (1000 mL)} \\ X \longrightarrow 50 \text{ mL} \qquad = 1,8 \text{ g de agar Caldo Cerebro-Corazón.} \end{array}$$

Se pesó esta cantidad y se mezcló con los 50 mililitros de agua destilada, para disolver el agar se calentó en el reverbero hasta que hierva por tres veces agitando constantemente, luego se esterilizó en autoclave a 121 psi por 15 minutos. Transcurrido este tiempo se sacó del autoclave y se deja que enfríe hasta que la palma de la mano aguante la temperatura del medio y luego se repartió en los tubos previamente esterilizados y se colocó las tapas. Luego se guarda en la refrigeradora a 4°C y al momento de utilizar los tubos se debe dejar al ambiente hasta que alcance la temperatura del ambiente.

2.10.5 Preparación del Agar Mueller-Hinton

Es un medio enriquecido, utilizado como medio de elección para realizar pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos.

Se utilizó el caldo Mueller-Hinton de la casa comercial Merck KGaA, Alemania.

Fórmula en g/L de agua destilada

- Infusión de carne: 300g
- Hidrolizado de caseína: 17,5g
- Almidón: 1,5g
- Agar: 17g
- pH: 7,4± 0,2 (ALBAREZ, et al., 1995, p. 34)

Para la preparación del medio se verificó las instrucciones, donde nos indicó que se necesita 38 gramos para 1 litro de agua destilada. Se preparó 400 mililitros para aproximadamente unas 19- 21 placas Petri.

$$\begin{array}{l} 38 \text{ g} \longrightarrow 1 \text{ L (1000 mL)} \\ X \longrightarrow 400 \text{ mL} \qquad = 15,2 \text{ g de agar Mueller-Hinton.} \end{array}$$

Se pesó esta cantidad y se mezcló con los 400 mililitros de agua destilada, para disolver el agar se calentó en el reverbero hasta que hierva por tres veces agitando constantemente, luego se

esterilizó en autoclave a 121 psi por 15 minutos. Transcurrido este tiempo se sacó del autoclave y se dejó que enfríe hasta que la palma de la mano aguante la temperatura del medio y luego se reparte en las placas, evitando que se formen burbujas de aire, en el caso que se formen con el asa de platino esterilizada por el fuego hasta rojo incandescente se pinchan la burbuja antes que el medio se solidifique. Una vez solidificado se guarda en la refrigeradora a 4°C.

2.10.6 Prueba de la sensibilidad a la Novobiocina

Los *Staphylococcus coagulasa* negativos pueden diferenciarse en dos grupos, según sean sensibles o no a la Novobiocina (5 µg).

Medio de cultivo.

Se utilizó el mismo medio que el recomendado para la técnica del antibiograma, es decir agar Mueller-Hinton.

Reactivo.

Disco de Novobiocina de 5 µg., que se adquirió de manera comercializada.

Inoculación.

Se Inoculó superficialmente una placa con agar Mueller-Hinton con una suspensión de microorganismos de concentración análoga a la utilizada para los antibiogramas. Se dejó reposar durante unos quince minutos a temperatura ambiente y se depositó el disco de novobiocina de 5 µg. en el centro de donde se sembró ya que la placa se dividió para dos microorganismos.

Incubación.

Incubar a 35-37°C durante veinticuatro horas.

Interpretación de los resultados.

Se considera al *Staphylococcus* sensible a la novobiocina cuando el halo de inhibición de crecimiento sea superior a 16 mm. (ALBAREZ, et al., 1995, pp. 133-134)

2.10.7 *Siembra en agar Manitol Salado*

Es un medio de cultivo altamente selectivo debido a su alta concentración salina. Los *Estafilococos* coagulasa positiva hidrolizan el manitol acidificando el medio. En el medio de cultivo, el manitol es el hidrato de carbono fermentable, el cloruro de sodio (que se encuentra en alta concentración) es el agente selectivo que inhibe el desarrollo de la flora acompañante, y el rojo fenol es el indicador de pH.

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.

Los *Estafilococos* crecen en altas concentraciones de sal, y pueden o no fermentar el manitol.

Los *Estafilococos* coagulasa positiva fermentan el manitol y se visualizan como colonias amarillas rodeadas de una zona del mismo color.

Los *Estafilococos* que no fermentan el manitol, se visualizan como colonias rojas, rodeadas de una zona del mismo color o púrpura.

Se utilizó el agar Manitol Salado de la casa comercial Merck KGaA, Alemania.

Fórmula en g/L de agua destilada

- Extracto de carne: 1.0g
- Pluripeptona: 10.0g
- d-Manitol: 10.0g
- Cloruro de sodio: 75.0g
- Agar: 15.0g
- Rojo de fenol: 0.025g
- pH: 7,4± 0.2

Para la preparación del medio se verificó las instrucciones, donde se indicó que se necesita 111 gramos para 1 litro de agua destilada. Se preparó 50 mililitros para aproximadamente unas 5-6 placas Petri.

111 g 1 L (1000 mL)
X 50 mL = 5,55 g de agar manitol salado.

Se pesó esta cantidad y se mezcló con los 50 mililitros de agua destilada, para disolver el agar se calentó en el reverbero hasta que hierva por tres veces agitando constantemente, luego se esterilizó en autoclave a 121 psi por 15 minutos. Transcurrido este tiempo se saca del autoclave y se deja que enfríe hasta que la palma de la mano aguante la temperatura del medio y luego se repartió en las placas, evitando que se formen burbujas de aire, en el caso de formarse, con el asa de platino esterilizada por el fuego hasta rojo incandescente, se pincha las burbujas antes que el medio se solidifique. Una vez solidificado se guarda en la refrigeradora a 4°C.

Para sembrar se utilizó colonias de veinte y cuatro horas, las cajas con el agar manitol salado se deja a temperatura ambiente, luego se codificó simultáneamente al sembrar, cada caja Petri se dividió por la mitad y se estrió una colonia en el agar, terminado este procedimiento se incuban las 5 cajas en la estufa a 35°C durante veinte y cuatro horas. Pasado este tiempo se observa si en las cajas existen crecimiento y además fermentación que se manifestó con una coloración amarilla sobre el agar de color rojo.

Las siguientes pruebas se realizaron solo para las colonias identificadas mediante la tinción GRAM como bacilos gram negativos, además de haber seleccionado 7 colonias.

2.10.8 Pruebas con agar Kligler

Es un medio utilizado preferentemente para la diferenciación de Enterobacteriaceae. En ellos se puede determinar las fermentaciones de los hidratos de carbono, la producción de gas y de sulfhídrico.

El agar hierro Kligler contienen dos azúcares: glucosa (0,1 por 100) y lactosa (1 por 100).

Medio de cultivo

Se utilizó el agar Kligler de la casa comercial Merck KGaA, Alemania.

Fórmula en g/L de agua destilada:

- Peptona de carne: 5g
- Extracto de carne: 3g
- Extracto de levadura: 3g
- Peptona de caseína: 15g
- Cloruro de sodio: 5g
- Lactosa: 10g

- D(+)-Glucosa: 1g
- Citato de amonio y hierro (II): 0,5g
- Tiosulfato sódico: 0,5g
- Rojo de fenol: 0,024g
- Agar: 12g
- pH: 7,4 ±0,2

Para la preparación del medio se verificó las instrucciones, donde se indicó que se necesita 55 gramos para 1 litros de agua destilada. Se preparó 50mL para aproximadamente unos 15-16 tubos.

$$55 \text{ g} \longrightarrow 1 \text{ L (1000 mL)}$$

$$X \longrightarrow 50 \text{ mL} = 2,75 \text{ g de agar Kligler.}$$

Se pesó esta cantidad y se mezcló con los 50 mililitros de agua destilada, para disolver el agar se calentó en el reverbero hasta que hierva por tres veces agitando constantemente, luego se esterilizó en autoclave a 121 psi por 15 minutos.

Transcurrido este tiempo se saca del autoclave y se deja que enfríe hasta que la palma de la mano aguante la temperatura del medio y luego se distribuyó en tubos previamente esterilizados y se dejó enfriar en posición inclinada, de forma que quede, aproximadamente un pico de flauta de 3,8 cm, y una capa basal de 2,5 cm de profundidad. Una vez solidificado se tapan y se guarda en la refrigeradora a 4°C.

Inoculación

Con una aguja de inoculación se tomó una colonia aislada y se sembró por picadura hasta unos 0,6 cm del fondo. Se retiró la guja siguiendo el mismo camino de entrada y, sin volver a cargar el asa, se sembró en estrías la superficie del pico de flauta.

Incubación

Incubar a 35-37°C durante dieciocho - veinticuatro horas. Es importante respetar estos tiempos de incubación, ya que lecturas de menor o mayor incubación pueden dar resultados falsamente positivos o negativos.

Interpretación de resultados

Se tendrán en cuenta los siguientes aspectos:

- Producción de ácido a partir de glucosa

Se pone de manifiesto en la parte inferior del medio al producirse un cambio de color debido al viraje del indicador de pH que pasa de rojo-naranja a amarillo (ácido).

- Producción de gas a partir de glucosa

Los gases producidos son el CO₂ y el H₂, productos terminales del metabolismo de la glucosa, que se aprecia por aparición de burbujas en la parte inferior del medio, por una producción de grietas en su interior o incluso por una elevación del medio que se separa del fondo.

- Producción de ácido a partir de la lactosa

Se aprecia por un cambio de color de rojo a amarillo en la parte del pico de flauta del medio.

- Producción de sulfhídrico

Se manifiesta por un ennegrecimiento del medio en la línea de inoculación o sobre la capa superficial. En cultivos de bacterias muy productoras de SH₂ a veces llega a ennegrecer todo el medio, ocultando la reacción ácida de la parte inferior del medio (tubo), pero si se ha formado SH₂ es que existe una condición ácida en esa zona por lo que se considerará el resultado, de la producción de ácido a partir de glucosa, como positivo. (ALBAREZ, et al., 1995, pp. 140-141)

2.10.9 Prueba del Citrato

Determina la capacidad que posee algunos microorganismos de utilizar como única fuente de carbono el citrato, produciendo alcalinidad.

Medio de cultivo.

El medio utilizado es el agar citrato de Simmons de la casa comercial Merck KGaA, Alemania.

Fórmula en g/L. de agar destilada:

- Cloruro sódico: 5g
- Sulfato magnésico: 0,2g
- Dihidrogenofosfato amónico: 1g

- Dihidrogenofosfato dipotásico: 1g
- Citrato sódico: 2g
- Agar: 13g
- Azul de bromotimol: 0,08g
- pH: $6,6 \pm 0,2$

Para la preparación del medio se verificó las instrucciones, donde nos indicó que se necesita 22,5 gramos para 1 litro de agua destilada. Se preparó 50 mililitros para aproximadamente unos 15-16 tubos.

$$\begin{array}{l}
 22,5 \text{ g} \longrightarrow 1 \text{ L (1000 mL)} \\
 X \quad \longrightarrow 50 \text{ mL} \quad = 1,125 \text{ g de agar Simmons Citrato.}
 \end{array}$$

Se pesó esta cantidad y se mezcló con los 50 mililitros de agua destilada, para disolver el agar se calentó en el reverbero hasta que hierva por tres veces agitando constantemente, luego se esterilizó en autoclave a 121 psi por 15 minutos.

Transcurrido este tiempo se saca del autoclave y se deja que enfríe hasta que la palma de la mano aguante la temperatura del medio y luego se distribuye en tubos previamente esterilizados a razón de 4 a 5 mililitros por tubo y dejar enfriar en posición inclinada, de forma que quede, aproximadamente un pico de flauta de 3,8 centímetros, y una capa basal de 2,5 centímetros de profundidad. Una vez solidificado se tapan y se guarda en la refrigeradora a 4°C.

Inoculación.

Inocular en estrías, en el pico de flauta, empezando desde el fondo hasta la parte más alta.

Incubación.

Incubar a 35-37°C durante veinticuatro a cuarenta y ocho horas.

Interpretación de los resultados.

Son dos aspectos que confirman la positividad de la prueba:

- La observación de crecimiento sobre el pico de flauta.

- La variación de coloración de verde a azul, debido a la alcalinización del medio, producida por la liberación de sodio del citrato utilizado, sodio, que con moléculas de agua presentes formará (OH)Na. (ALBAREZ, et al., 1995, p. 116).

2.10.10 Prueba de la Urea

Determina la capacidad de un organismo para desdoblar la urea, en aminoácido y CO₂, por acción de la enzima ureasa. La visualización del proceso se fundamenta en que la alcalinización producida en el medio de cultivo se detecta mediante un indicador de pH (rojo de fenol).

Medio de Cultivo

Se utilizó el agar Urea de la casa comercial Merck KGaA, Alemania.

Fórmula en g/L de agua destilada

- Tripteína; 1,0 g
- Glucosa: 1,0g
- Cloruro de sodio: 5,0g
- Fosfato Monopotásico: 2,0g
- Urea: 20,0g
- Rojo de fenol: 0,012g
- Agar: 15,0g
- pH: 6,8 ±0,2

Para la preparación del medio se verificó las instrucciones, donde se indicó que se necesita 21gramos para 1 litro de agua destilada. Se preparó 60 mililitros para aproximadamente unos 15-16 tubos.

$$\begin{array}{l}
 21 \text{ g} \longrightarrow 1 \text{ L (1000 mL)} \\
 X \longrightarrow 60 \text{ mL} \qquad = 1,26\text{g de agar Urea.}
 \end{array}$$

Solución de urea básica

Se utilizó una solución de urea al 40%. Se pesó 4 gramos de urea deshidratada y se disolvió en 10 mililitros de agua destilada. No debe calentarse la solución ya que la urea se desnaturaliza por el calor. Por lo tanto se esterilizó por filtración.

La filtración se realizó con una membrana de filtración de la casa comercial MILLEX® GP de 0.22µ, Millipore Express® PES Membrane y una jeringa estéril de 5 mililitros.

50mL ———> 1 L (1000 mL)

X ———> 60 mL = 3 mL de solución de Urea al 40%.

Se pesó 1,26g de agar Urea y se mezcló con los 60 mililitros de agua destilada, para disolver el agar se calentó en el reverbero hasta que hierva por tres veces agitando constantemente, luego se esterilizó en autoclave a 121 psi por 15 minutos.

Transcurrido este tiempo se saca del autoclave y se deja que enfríe hasta 50 - 55°C y se añade los 3 mililitros de solución estéril de urea al 40%, luego se distribuye asépticamente en tubos previamente esterilizados y se deja enfriar en posición inclinada, de forma que quede, aproximadamente un pico de flauta de 3,8 cm, y una capa basal de 2,5 cm de profundidad. Una vez solidificado se tapan y se guarda en la refrigeradora a 4°C.

Inoculación.

Inocular en estrías, en el pico de flauta, empezando desde el fondo hasta la parte más alta.

Incubación.

Incubar a 35-37°C durante veinticuatro a cuarenta y ocho horas.

Interpretación de los resultados.

Se considera la prueba positiva si el medio adquiere una tonalidad rosada, y negativa si mantiene su coloración inicial.

2.10.11 Siembra en agar semisólido SIM

Este medio de cultivo sirve para la detección de la producción de sulfuro, formación de indol y motilidad.

Medio de Cultivo

Se utilizó el agar semisólido SIM de la casa comercial Merck KGaA, Alemania

Fórmula en g/L de agua destilada

- Digerido pancreático de caseína: 20,0g
- Digerido péptico de tejido animal: 6,1g
- Sulfato ferroso de amonio: 0,2g
- Tiosulfato sódico: 0,2g
- Agar: 3,5g
- pH: 7,3 ± 0,2

Para la preparación del medio se verificó las instrucciones, donde indica que se necesita 30 gramos para 1 litros de agua destilada. Se preparó 50 mililitros para aproximadamente unos 15-16 tubos.

$$\begin{array}{l} 30 \text{ g} \longrightarrow 1 \text{ L (1000 mL)} \\ X \longrightarrow 50 \text{ mL} \qquad = 1,5 \text{ g de agar SIM.} \end{array}$$

Se pesó esta cantidad y se mezcló con los 50 mililitros de agua destilada, para disolver el agar se calentó en el reverbero hasta que hierva por tres veces agitando constantemente, luego se esterilizó en autoclave a 121 psi por 15 minutos. Transcurrido este tiempo se sacó del autoclave y se dejó enfriar hasta que la palma de la mano aguante la temperatura del medio, luego se distribuyó en tubos previamente esterilizados a razón de 4 a 5 mililitros por tubo y se dejó enfriar en posición vertical. Finalmente se tapan y se guarda en la refrigeradora a 4°C.

2.10.11.1 Prueba de la movilidad

La movilidad es una característica importante al hacer una determinación bacteriana, pues indirectamente señala que el microorganismo posee flagelos, rasgo taxonómico que es difícil poner de manifiesto por otros métodos, incluidos los tintoriales.

Existen varias técnicas que permiten demostrar la movilidad bacteriana, entre ellas destacamos:

- Las que se visualizan microscópicamente.
- Las que se observan por cultivo en medios semisólidos.

Debido al inconveniente que posee el primero para observadores poco expertos, de confundir el movimiento activo de células con el movimiento pasivo browniano, se optó por el segundo, por el cultivo en medios semisólidos.

Por cultivo en medio semisólido

Los medios de cultivo para la observación de la movilidad contienen 0,4 por 100 de agar, lo que permite ver el desplazamiento de las bacterias, si existe.

Inoculación

Se siembra por picadura en el centro del medio, introduciendo la aguja con cuidado hasta unos 0,6 cm del fondo y extrayendo la aguja siguiendo el mismo recorrido de entrada.

Incubación

Se incubaron los tubos a 35-37°C.

Interpretación de los resultados

El test de movilidad se interpreta por un examen macroscópico del medio. Si el microorganismo es móvil, se producirá una zona de difusión del crecimiento a los lados de la línea de inoculación. Si la bacteria es inmóvil, crecerá sobre la línea de siembra.

Hay algunos medios de cultivo de identificación que permiten observar, además de dos pruebas bioquímicas, si el microorganismo sembrado es móvil o no. Entre ellas destacamos el sulfhídrico-indol-movilidad, el movilidad-indol-ornitina y el manitol-movilidad-nitrato. En ellos la movilidad se interpretará antes de adicionar los reactivos. (ALBAREZ, et al., 1995, p. 130).

2.10.11.2 Producción del Indol

La prueba de indol determina la capacidad de las bacterias de degradar el triptófano dando indol. Algunas bacterias, gracias a la enzima triptofanasa hidrolizan el aminoácido, dando indol, ácido pirúvico y amoníaco. La presencia de indol se destaca observando la formación de una coloración rosa-roja en el medio al añadir para-dimetilaminobenzaldehído.

Reactivos

Se pueden utilizar dos reactivos: reactivo de Kovacs y reactivo de Ehrlich. Por la facilidad de disposición se utilizó el primero, pero hay autores que aconsejan el segundo, especialmente para determinados anaerobios.

Reactivo de Kovacs

- Alcohol amílico o isoamílico: 150mL
- Para- dimetilamino benzaldehído: 10g
- Ácido clorhídrico concentrado: 50mL

El reactivo es de color amarillo y se guarda protegido de la luz y a 4°C.

Inoculación

Sobre el tubo con SIM una vez que se observó el crecimiento y la motilidad se añadió dos a tres gotas sobre la superficie.

Interpretación de resultados

Después de la adición de las gotas del reactivo de Kovacs y agitando suavemente, puede aparecer un anillo de color rojo en la superficie del medio, esto indica producción de indol.

Si no se forma el anillo rojo, se considera la prueba negativa. (ALBAREZ, et al., 1995, p. 127)

2.11 Determinar los perfiles de resistencia antimicrobiana de las bacterias identificadas.

De las colonias aisladas e identificadas tenemos 13 bacterias.

2.11.1 Preparación de la escala McFarland

Para preparar la escala nefelométrica de McFarland se necesitan 10 tubos de igual tamaño y grosor perfectamente limpios. Se dispondrá también de ácido sulfúrico químicamente puro al 1 por 100, también puro químicamente.

Al mezclar diferentes proporciones diferentes porciones de ambas soluciones se consideran distintas densidades, que están relacionadas con crecimientos bacterianos.

En la tabla siguiente se detallan las proporciones de ambos constituyentes y el recuento aproximado de bacterias:

Tabla 8-2. Proporciones de los constituyentes para la escala McFarland.

Tubo número	0,5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Cloruro de bario al 1 por 100.	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1
Ác. sulfúrico al 1 por 100	9,95	9,9	9,8	9,7	9,6	9,5	9,4	9,3	9,2	9,1	9
Densidad celular X 10^8 /mL.	1,5	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30

Fuente: (ALBAREZ, et al., 1995, p. 258)

Se preparó el tubo 0,5 con un contenido de cloruro de bario de 0,05 y Ácido sulfúrico de 9,95, se mantiene en refrigeración a 4°C.

2.11.2 Antibiograma

En la actualidad, el antibiograma es una técnica perfectamente estandarizada que permite, *in vitro*, definir claramente los conceptos de sensibilidad y resistencia, relacionándolos con lo que ocurre *in vivo*.

Un microorganismo se considera sensible a un determinado antibiótico cuando éste puede alcanzar niveles plasmáticos iguales por lo menos a la concentración mínima inhibitoria (CMI), en el lugar de la infección. Se considera como CMI, la mínima cantidad de antimicrobiano capaz de inhibir el crecimiento de una microorganismo.

Un microorganismo se considera resistente a un antibiótico cuando la concentración máxima de antimicrobiano que se puede conseguir en el lugar de la infección no es suficiente para afectarle, o, dicho de otra forma, que la concentración de la droga en aquel punto es inferior a la CMI necesaria para eliminar el germen, y que por efectos secundarios tóxicos es imposible elevar la dosis.

Entre estas dos categorías se establece la de germen de sensibilidad intermedia, que es la que se refiere al microorganismo que no es afectado por la dosis normales de antibiótico dadas a intervalos adecuados, pero que si la dosis se eleva sin que exista efectos tóxicos, o si se produce una acumulación en el lugar de la infección, se puede llegar a erradicar.

Para realizar el antibiograma de una muestra, se efectuó el aislamiento por agotamiento en placa de los microorganismos presentes en ella, utilizando medios de cultivo apropiados y a la atmósfera de incubación adecuada como ya se ha indicado anteriormente. Además como norma

básica y estricta en microbiología el «No efectuar un antibiograma con mezclas de gérmenes, ni directamente del producto patógeno».

2.11.2.1 Metodología

Un estudio de sensibilidad a los antibióticos consiste básicamente en someter a un determinado número de microorganismos procedentes de un mismo clon (inóculo), a la acción de una o varias concentraciones de antimicrobianos, y observar después de la oportuna incubación si se produce o no crecimiento.

Medio de cultivo

Debe cumplir las condiciones:

- Ser de amplio espectro nutritivo, para que permita el crecimiento de la mayoría de los microorganismos.
 - Ser de pH estable (7,2- 7,4), y no sufrir oscilaciones por acción de los microorganismos sobre los componentes del medio: la acidez favorece la actividad de beta-lactámicos, tetraciclinas y novobiocina, y la alcalinidad la de aminoglicósidos y macrólidos.
 - No debe contener inhibidores de antimicrobianos, como son:
 - Las peptonas que inactivan a derivados sulfamínicos.
 - Los fosfatos, el NaCl y el extracto de cerebro (lecitina), que inactivan a aminoglicósidos y polimixinas (colistinas).
 - Las sales de Ca^{++} y Mg^{++} , que forman compuestos quelantes con betalactámicos y tetraciclinas.
 - El PABA o cualquier otro antagonista por competencia.
 - El suero sanguíneo, las proteínas que lleva incorporadas ligan a los antimicrobianos, disminuyendo su acción.
 - Los glúcidos, que en medios mal taponados podrían dar lugar a una disminución del pH.
- (ALBAREZ, et al., 1995, pp. 227-228)

Además el medio de cultivo debe contener la mínima cantidad posible de timina y timidina, ya que su presencia disminuye la acción de sulfamidas y trimetoprim, por lo tanto, el que mejor cumple las anteriores condiciones, y es apto para cualquier tipo de antibiograma es el de Mueller-Hinton, especialmente para la técnica de disco-placa, pues el diámetro del halo de inhibición está íntimamente relacionado con la velocidad de difusión del antimicrobiano y la rapidez del crecimiento superficial del germen.

Las placas con Mueller-Hinton, guardadas en refrigeración, antes de utilizarse es necesario incubarlas en posición invertida, en estufa a 35-37°C, o dejarlas a temperatura ambiente hasta que alcancen la del laboratorio.

Preparación del Inóculo. Inoculación.

Se preparó suspendiendo con un hisopo estéril cuatro o cinco colonias iguales de un cultivo joven en 5 mL de solución salina estéril, homogeneizando bien y visualmente se ajustó con solución salina o añadiendo más colonias hasta una turbidez análoga a la que presenta el estándar 0,5 de McFarland que se preparó anteriormente, la suspensión bacteriana una vez preparada debe sembrarse antes de veinte minutos.

Para la inoculación se sumergió un hisopo de algodón en la suspensión microbiana y se eliminó el exceso haciéndolo rotar contra la pared del tubo. El hisopo se pasó por la superficie del agar en varias direcciones, con el fin de sembrar uniformemente el medio de cultivo, el cual se dejó secar posteriormente por espacio de diez minutos.

Colocación de los discos o comprimidos

Los discos utilizados, que son de papel estéril y contienen cantidades valoradas de antibiótico, se mantienen en refrigeración a 4°C, excepto los derivados beta-lactámicos, que se almacenan a 20°C para evitar que pierdan potencia, guardándose solo en la nevera aquellos que se vayan a utilizar en un periodo breve de tiempo.

La colocación se efectúa individualmente mediante pinzas flameadas, asegurándose posteriormente de que mantengan un perfecto contacto con la superficie del medio, por lo que al colocar el disco se da unos tres toques suaves en la parte de arriba del disco. Por placa de 9 cm de diámetro pueden utilizarse de seis a ocho discos.

En las bacterias bacilos Gram negativos se utilizaron los discos de sensibilidad de: Ciprofloxacina (CIP 5µg), Gentamicina (CN 10 µg), Meropenem (MEM 10 µg), Ampicilina (AMP 10 µg), Estreptomicon (S 300 µg), Trimetoprim-Sulfametoxazol (SxT 25 µg) y Minociclina (MH 30 µg), mientras que en las bacterias cocos Gram positivos se utilizaron los discos de sensibilidad antes mencionados además de la Meticilina (ME 5 µg).

Antes de incubar, dejar reposar las placas a temperatura ambiente durante unos seis minutos (no más de diez minutos) para que los discos hagan una predifusión.

CAPÍTULO III

3 MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

3.1 Tomar la muestra de agua de consumo siguiendo protocolos que permitan un muestreo y transporte adecuado de acuerdo a la Norma NTE INEN 2176: 2013.

Previo el análisis microbiológico de las muestras de agua fue necesario realizar una toma de las muestras siguiendo protocolos, los cuales permitan un muestreo y transporte adecuado para la presente investigación. En este estudio se utilizó las técnicas de captación en grifos y transporte de las muestras como menciona Guevara Antonio (1996), las cuales permitieron adoptar todas las precauciones con la finalidad de asegurarse que las muestras de agua a analizar sean representativas y evitar la contaminación de la misma durante el proceso de muestreo.

Adaptando en ocasiones la técnica ya que las botellas de vidrio neutro con tapa de vidrio esmerilado o de baquelita no se pudo obtener y se reemplazó con frascos de plásticos estériles desechables, que se utilizan para la recolección de orina, los cuales se ocuparon para la recolección de la muestra de agua potable y colocándolas en un coolers.

Además se tomó en cuenta la técnica de Identificación y Registros de la Norma NTE INEN 2176: 2013, “Agua. Calidad del Agua. Muestreo. Técnicas de muestreo”, donde se incluyó algunos datos para el informe de muestreo, este proceso es de gran importancia ya que permite la verificación del origen de las muestras, las condiciones bajo las cuales fueron recogidas en el momento del muestreo, ya que un análisis de agua es de valor limitado si no está acompañado por la identificación detallada de la muestra, asimismo la toma correcta de la muestra permite un seguro y confiable resultado en la investigación.

3.2 Cuantificación las bacterias heterótrofas aerobias mesófilas presentes en las muestras del agua de consumo.

Los resultados obtenidos en la cuantificación de las bacterias heterótrofas aerobias mesófilas, en primer lugar hay que recalcar que se obtuvo un crecimiento mayoritario en las muestras de agua embotellada, en las cuales se observó que en todas las cinco muestras existió crecimiento, luego de 24 horas las cuales fueron: M6, M7, M9, M10 y en la muestra M8 se observó crecimiento

aproximadamente una semana; y solo en dos muestras de las seis de agua potable se observó crecimiento, luego de 24 horas la muestra M11 y en la muestra M3 se observó crecimiento después de una semana, por lo tanto se obtuvo un crecimiento en siete muestras de un total de once. (Ver Figura 11-3 y Tabla 9-3).

Tabla 9-3: Cuantificación de las bacterias heterótrofas aerobias mesófilas en muestras de agua potable y envasada de la ciudad de Riobamba

PETRIFILM	MUESTRA	COLONIAS	UFC/mL
1	M6	MNPC (Muy numeroso para contar)	Incontable
2	M6	MNPC (Muy numeroso para contar)	Incontable
1	M7	20	400
2	M7	19	380
1	M8	11	220
2	M8	8	160
1	M9	10	200
2	M9	9	180
1	M10	1	1
1	M3	2	20
2	M3	4	25
1	M11	16	320
2	M11	25	500

Realizado por: Erika Vargas, 2015

Es decir, del total de siete muestras donde existió crecimiento se obtuvo un 63.64% de presencia bacteriana, de las cuales el 18.18% corresponde a las muestras de agua potable (2 muestras) y el 45.45% corresponde a las muestras de agua envasada (5 muestras), mientras que el total de las muestras donde no existió crecimiento se obtuvo un 36.36% representado por las cuatro muestras de agua potable y un 0% en las muestras de agua envasada.

Por último, para la cuantificación en las muestras donde existió crecimiento en las placas de petrifilm, se realizó el recuento de Aerobios y se obtuvieron valores mayores en las muestras de agua embotellada en comparación con las muestras de agua potable. (Ver Tabla 9-3).

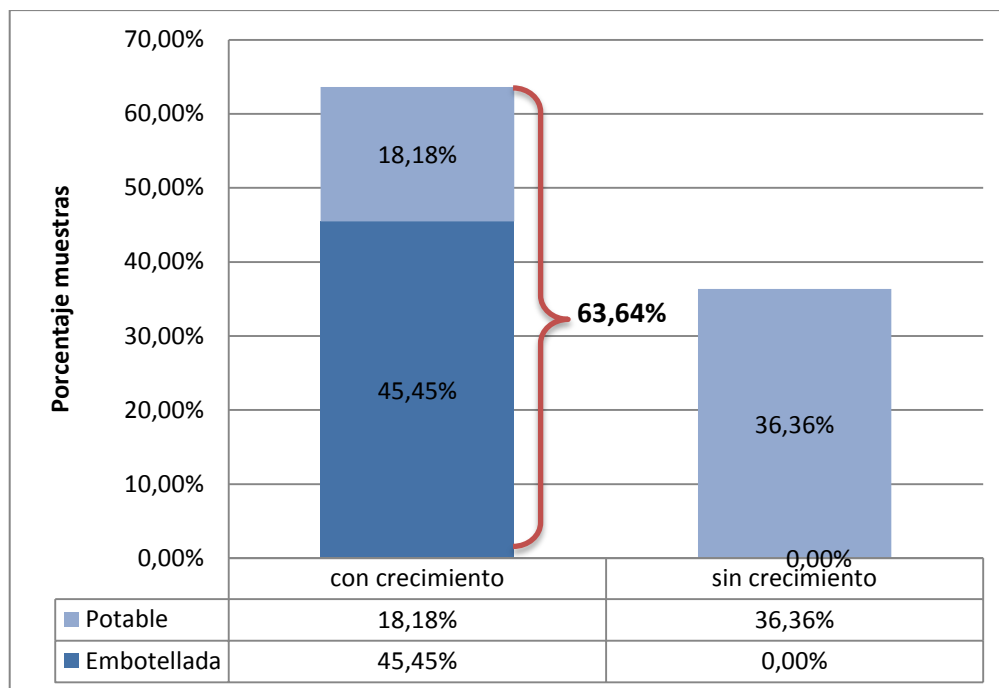


Gráfico 1-3: Porcentaje de crecimiento bacteriano en las muestras de agua potable y agua envasada obtenida en la ciudad de Riobamba

Realizado por: Erika Vargas, 2015

Estudios realizados en casos similares corroboran los resultados obtenidos como por ejemplo un estudio de Aparico Lizeth y Ladino Oscar, sobre Evaluación de la calidad microbiológica y físico-química de aguas envasadas en bolsas distribuidas en el área metropolitana de San Salvador en el periodo de septiembre – octubre de 2007, indica que el recuento de bacterias heterótrofas presentaron en los tres muestreos niveles superiores a los límites establecidos en el recuento según la NSO 13.07.02:07, excepto 2 marcas, por tanto, el recuento alto de estas bacterias en las 8 marcas restantes indica que existen deficiencias en los procesos de tratamiento del agua, o en almacenamiento y manipulación. (APARICO, Lizeth y LADINO Oscar, 2011, pp 45)

Un estudio realizado por Rojas, Tomás y colaboradores, sobre Bacilos gram negativos no fermentadores en agua embotellada: susceptibilidad antimicrobiana y formación de biopelículas, muestran resultados similares, donde de las 50 muestras de 250 seleccionadas al azar, existió un 92% y el 84% de las muestras presentaron coliformes totales y termotolerantes respectivamente, mientras que el 86% presentó heterótrofos aerobios con cuentas >150 UFC/mL, valores por encima de lo establecido en la Gaceta Oficial Venezolana N.º 36.395. (Rojas, Tomás, et. al, 2014)

Un estudio realizado por Villegas, Verónica, en muestras de agua envasada en funda en el cantón Shushufindi, provincia de Sucumbíos, indica que la cuantificación de mesófilos aerobios en las marcas de agua, en su totalidad exceden la cantidad de mesófilos aerobios permitidos por la norma lo que indica una contaminación de las aguas. (VILLEGAS JIMÉNEZ, 2013, p. 83).

Por otra parte un estudio realizado por Cutimbo, César, sobre Calidad bacteriológica de las aguas subterráneas de consumo humano en centros poblados menores de la Yarada y los Palos del Distrito de Tacna, donde se analizó 46 muestras de agua subterránea provenientes de pozos entre los meses Abril y Junio, presentaron un agua para el consumo humano con recuento de bacterias heterotróficas 2%, para coliformes totales 54% y para bacterias termotolerantes 11%, encontraron bacteriológicamente aptas para el consumo humano en 21 pozos (46%) y 25 (54%) no aptas. (CUTIMBO, César, pp, 4-5).

Un estudio de Cajamarca, Byron y Contreras, Luis, sobre Control microbiológico del agua potable de uno de los sistemas de abastecimiento del cantón Cuenca, a través de microorganismos indicadores, muestran que un análisis que realizaron entre los meses de Junio y Agosto del año 2011, estudiaron un total de 82 muestras entre agua cruda, agua tratada y agua en inmuebles. Encontraron los requisitos microbiológicos de acuerdo a lo establecido en la Norma NTE INEN 1108: 2006, un total de 100% de muestras aptas para su consumo, así como un 98,54% de idoneidad de acuerdo a los indicadores estudiados según los Métodos Normalizados para el Análisis de Aguas Potables y Residuales de la APHA, AWWA, WPCF; presentándose únicamente la presencia de Bacterias heterotróficas. (CAJAMARCA, Byron y CONTRERAS, Luis, 2011, <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/2450/1/tq1094.pdf>).

Un estudio realizado por Sotomayor, Jorge, sobre Análisis de la concentración de microorganismos en el agua para consumo humano, en San Cristóbal, Provincia de Galápagos – Ecuador, realizaron muestreos de agua en 38 puntos de la localidad incluyendo las dos plantas de tratamiento de agua, tanques reservorios, viviendas locales y empresas embotelladoras de agua, mencionando en los resultado que las plantas de tratamiento están funcionando bien y en la mayoría de los casos la comunidad está recibiendo agua potable de calidad. (SOTOMAYOR, Jorge, 2014, <http://es.ecomarytierra.org>).

Un estudio realizado por CASTILLO, Liseth y colaboradores sobre el “Aislamiento y selección de *coliformes fecales* resistentes a antibióticos provenientes de dos plantas de tratamiento de aguas residuales de la ciudad de Puebla”. Mostró que no existe una elevada presencia de microorganismos en el río Almendares y además, que entre los aislados predominaron las bacterias gram positivas, correspondiente a los géneros *Micrococcus*, *Bacillus* y *Staphylococcus*. Estos resultados se corresponden con los informados por otros investigadores, quienes al evaluar la carga microbiana en otros ecosistemas contaminados, detectaron un bajo número de aislados bacterianos con predominio de bacterias gram positivas identificadas como especies de los géneros *Arthrobacter* y *Bacillus*. (CASTILLO, et al., 2009, p. 6)

Por lo tanto las Bacterias Heterotróficas están presentes en todos los cuerpos de agua y constituyen un grupo de bacterias ambientales de amplia distribución, éstas son indicadoras de la eficacia de los procesos de tratamiento, principalmente de la desinfección (descontaminación).

3.3 Aislamiento y purificación de las colonias de bacterias heterótrofas aerobias mesófilas presentes en las muestras del agua de consumo.

Se pudo aislar fácilmente y purificar las colonias para la identificación bacteriológica al utilizar la técnica de estrías y la siembra en estrías por agotamiento por cuadrantes en agar Nutritivo, obteniendo un total de 31 bacterias puras. Para el aislamiento se tomó en cuenta que cada clon tenga alguna diferencia fenotípica, ya sea en el tamaño, color o forma. Ya que al utilizar estos métodos es posible separar una masa de bacterias individuales en unidades que forman colonias. Cada una de estas unidades se desarrollan en colonias discretas que muestran características que ayudan a identificar el microorganismo. (Universidad de Granada, 2015, <http://www.pomif.com/pages/practicas/bacteriologia/aislamiento>).

3.4 Caracterización macroscópica y microscópica de los aislados bacterianos encontrados.

En primer lugar, el código dado a las muestras se llevó de la siguiente manera M es la inicial de muestra, el número que le sigue corresponde al número de la muestra dado anteriormente a cada una de las muestras, la siguiente es una letra minúscula a, b, c o d que corresponde al número de bacterias aisladas de una misma muestra y finalmente el número final 1 o 2 corresponde al pretrifilm primero o segundo respectivamente.

Para la caracterización macroscópica de las 31 bacterias aisladas y purificadas se tomó muy en cuenta las principales características ópticas de desarrollo como fueron el color, tamaño, elevaciones, margen o bordes, etc., por lo tanto se pudo observar que existieron bacterias de color anaranjado, blancas y otras de color blanco cremoso entre tamaños variados menores a un milímetros y mayores a un milímetros, incluso unas de difícil crecimiento en agar nutritivo como fue el caso de la muestra M8 y M3. (Ver cuadro 10-3).

En la caracterización microscópica de las 31 bacterias aisladas y purificadas mediante la Tinción Gram y la observación en el microscopio se determinaron en un porcentaje similar de 42% tanto de cocos Gram positivos como de bacilos gram negativos. (Ver gráfico 1-3).

Y un 16% se obtuvo crecimiento de hongos pertenecientes a las muestras M3 y M8 ya que mediante el Gram y la observación al microscopio se determinaron que eran hongos debido a su gran tamaño esférico además de observar la gemación de algunas esporas.

Tabla 10-3: Caracterización macroscópica y diferenciación por la tinción GRAM de colonias bacterianas aisladas y purificadas en muestras de agua potable y agua envasada de la ciudad de Riobamba.

#	Muestra	Código	COLONIAS	GRAM
1	M6	M6a2	Blancas 1mm	Cocos (+)
2	M6	M6a1	Blancas 1mm	Cocos (+)
3	M6	M6b1	Blancas >1mm	Cocos (+)
4	M7	M7a1	blancas cremosas 1mm	Cocos (+)
5	M7	M7a2	blancas cremosas 1mm	Cocos (+)
6	M7	M7b1	blancos < 1mm	Cocos (+)
7	M7	M7b2	blancos < 1mm	Cocos (+)
8	M7	M7c2	naranja > 1mm	Cocos (+)
9	M7	M7d2	blancos >1mm	Cocos (+)
10	M7	M7c1	naranja > 1mm	Cocos (+)
11	M7	M7d1	blancos >1mm	Cocos (+)
12	M9	M9a1	blancos >1mm	Bacilos (-)
13	M9	M9a2	blancos < 1mm	Bacilos (-)
14	M9	M9b1	blancos <1mm	Bacilos (-)
15	M9	M9b2	blancos >1mm	Bacilos (-)
16	M9	M9c1	blancos cremosos < 1mm	Bacilos (-)
17	M9	M9c2	blancos cremosos < 1mm	Bacilos (-)
18	M9	M9d1	blancos <1mm	Bacilos (-)
19	M10	M10a1	blancos <1mm	Cocos (+)
20	M10	M10a1	blancos <1mm	Cocos (+)
21	M11	M11a1	blancos 1mm	Bacilos (-)
22	M11	M11b1	blancos cremosos 1mm	Bacilos (-)
23	M11	M11b2	blancos cremosos 1mm	Bacilos (-)
24	M11	M11c1	blancos 1mm	Bacilos (-)
25	M11	M11c2	blancos 1mm	Bacilos (-)
26	M8	M8	blancos <1mm	hongos
27	M8	M8	blancos <1mm	hongos
28	M3	M3b1	naranja 1mm	hongos
29	M3	M3a1	naranja 1mm	hongos
30	M3	M3a2	naranja 1mm	hongos
31	M11	M11d1	blancos 1mm	Bacilos (-)

Realizado por: Erika Vargas, 2015

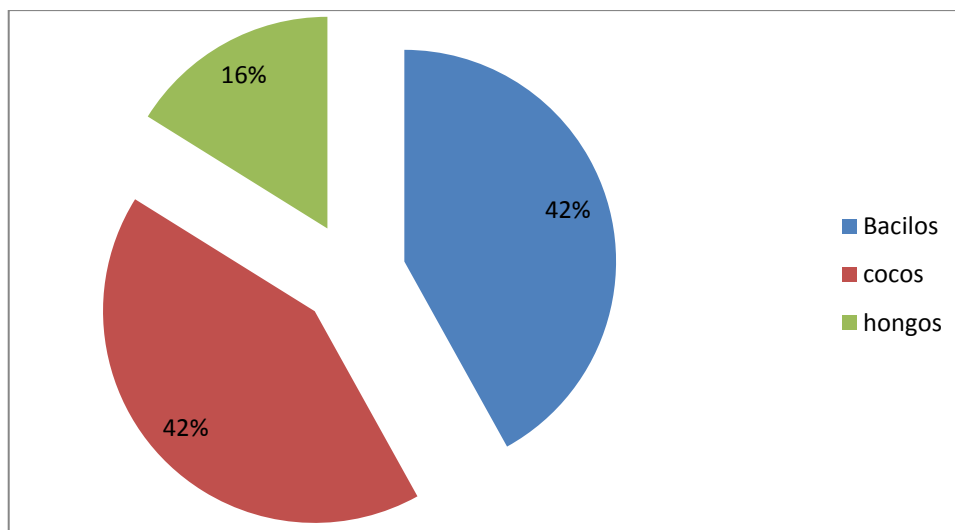


Gráfico 2-3: Porcentaje de tipos de bacterias según la tinción GRAM aislados de muestras de agua potable y envasada de la ciudad de Riobamba.

Realizado por: Erika Vargas, 2015

3.5 Identificación taxonómica de bacterias aisladas y purificadas de las muestras de agua potable y envasada.

En la identificación de los aislados bacterianos se descartó los aislados que fueron identificados como hongos, por lo tanto se realizó a las 26 bacterias aisladas las pruebas de Catalasa y Oxidasa cuyos resultados fueron:

Tabla 11-3: Pruebas de Catalasa y Oxidasa de las colonias bacterianas aisladas de muestras de agua potable y envasada de la ciudad de Riobamba.

#	Muestra	Código	GRAM	Prueba Catalasa	Prueba Oxidasa
1	M6	M6a2	Cocos (+)	Positivo	Negativo
2	M6	M6a1	Cocos (+)	Positivo	Negativo
3	M6	M6b1	Cocos (+)	Positivo	Negativo
4	M7	M7a1	Cocos (+)	Negativo	Negativo
5	M7	M7a2	Cocos (+)	Negativo	Negativo
6	M7	M7b1	Cocos (+)	Negativo	Negativo
7	M7	M7b2	Cocos (+)	Negativo	Negativo
8	M7	M7c2	Cocos (+)	Positivo	Positivo
9	M7	M7d2	Cocos (+)	Negativo	Negativo
10	M7	M7c1	Cocos (+)	Positivo	Positivo
11	M7	M7d1	Cocos (+)	Negativo	Positivo
12	M9	M9a1	Bacilos (-)	Negativo	Negativo
13	M9	M9a2	Bacilos (-)	Negativo	Positivo

14	M9	M9b1	Bacilos (-)	Negativo	Positivo
15	M9	M9b2	Bacilos (-)	Negativo	Positivo
16	M9	M9c1	Bacilos (-)	Negativo	Positivo
17	M9	M9c2	Bacilos (-)	Negativo	Positivo
18	M9	M9d1	Bacilos (-)	Negativo	Positivo
19	M10	M10a1	Cocos (+)	Positivo	Negativo
20	M10	M10a1	Cocos (+)	Positivo	Negativo
21	M11	M11a1	Bacilos (-)	Positivo	Positivo
22	M11	M11b1	Bacilos (-)	Negativo	Positivo
23	M11	M11b2	Bacilos (-)	Negativo	Positivo
24	M11	M11c1	Bacilos (-)	Negativo	Positivo
25	M11	M11c2	Bacilos (-)	Positivo	Positivo
31	M11	M11d1	Bacilos (-)	Positivo	Positivo

Realizado por: Erika Vargas, 2015

Luego se seleccionó seis bacterias, esta selección se efectuó tomando en consideración que tengan características diferentes y sean de diferentes muestras, es así que del grupo de los cocos Gram positivos se eligieron las muestras con la numeración: 1, 3, 4, 7, 9 y 10 a este grupo se realizaron las pruebas de Coagulasa, sensibilidad a Novobiocina y se sembró en Manitol Salado, luego se procedió a la identificación a nivel de género de las bacterias con ayuda de tablas de comparación bacteriológica disponibles en manuales de técnicas en microbiología clínica. (MacFalden, 2003).

Tabla 12-3: Pruebas realizadas a las colonias aisladas y purificadas de Cocos GRAM Positivos obtenidos de las muestras de agua potable y envasada.

#	Código Muestra	Prueba Coagulasa	Prueba Catalasa	Prueba Oxidasa	Manitol Salado	Sensibilidad Novobiocina	Identificación
1	M6a2	Negativo	Positivo	Negativo	No crece	17mm	<i>Staphylococcus spp</i>
3	M6b1	Negativo	Positivo	Negativo	No crece	20mm	<i>Staphylococcus spp</i>
4	M7b	Negativo	Negativo	Negativo	No crece	22mm	<i>Staphylococcus spp</i>
7	M7b1	Negativo	Negativo	Negativo	No crece	15mm	<i>Staphylococcus spp</i>
9	M7a	Negativo	Negativo	Negativo	No crece	28mm	<i>Enterococcus</i>
10	M7a1	Negativo	Positivo	Positivo	Crece y fermenta	34mm	<i>Micrococcus</i>

Realizado por: Erika Vargas, 2015

Por lo tanto se obtuvo un 66,67% de bacterias pertenecientes al género *Staphylococcus spp.* y un 16,67% de bacterias *Enterococcus* al igual que del género *Micrococcus*.

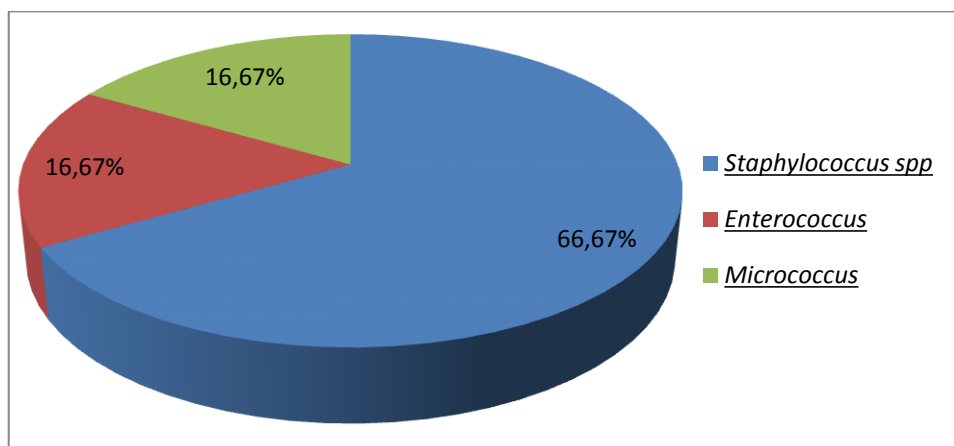


Gráfico 3-3: Porcentaje de bacterias identificadas de cocos Gram positivos

Realizado por: Erika Vargas, 2015

Luego se seleccionó siete bacterias del grupo de los bacilos gram negativos, esta selección se efectuó tomando en consideración que tengan características diferentes y sean de diferente muestras, es así que se eligieron las muestras con la numeración: 12,15,17,18,21, 23 y 31 a este grupo se realizaron las pruebas bioquímicas, luego de la obtención de resultados se procedió a la identificación a nivel de género de las bacterias con ayuda de tablas de comparación bacteriológica disponibles en manuales de técnicas en microbiología clínica. (MacFalden, 2003).

Tabla 13-3: Pruebas realizadas a las colonias aisladas y purificadas de Bacilos GRAM Negativos obtenidos de las muestras de agua potable y envasada.

#	Código	CATALASA	OXIDASA	SIM		SIMMONS CITRATO	UREA	KLIGLER				Identificación
				INDOL	MOVILIDAD			Gluc	Lac	SH2	CO2	
12	9a	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Burkholderia cepacia</i>
15	9b	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Pseudomonas spp.</i>
17	9c	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	<i>Pseudomona spp.</i>
18	9d	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Pseudomona spp.</i>
21	11a	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	<i>Brevundimonas diminuta</i>
23	11b	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>Ralstonia pickettii</i>
31	11c	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	<i>Brevundimonas diminuta</i>

Realizado por: Erika Vargas, 2015

Por lo tanto se obtuvo un 42,86% de bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas spp.*, un 14,29% de bacterias de la especie *Burkholderia cepacia*, y *Ralstonia pickettii*, y finalmente un 28,57% de *Brevundimona diminuta*.

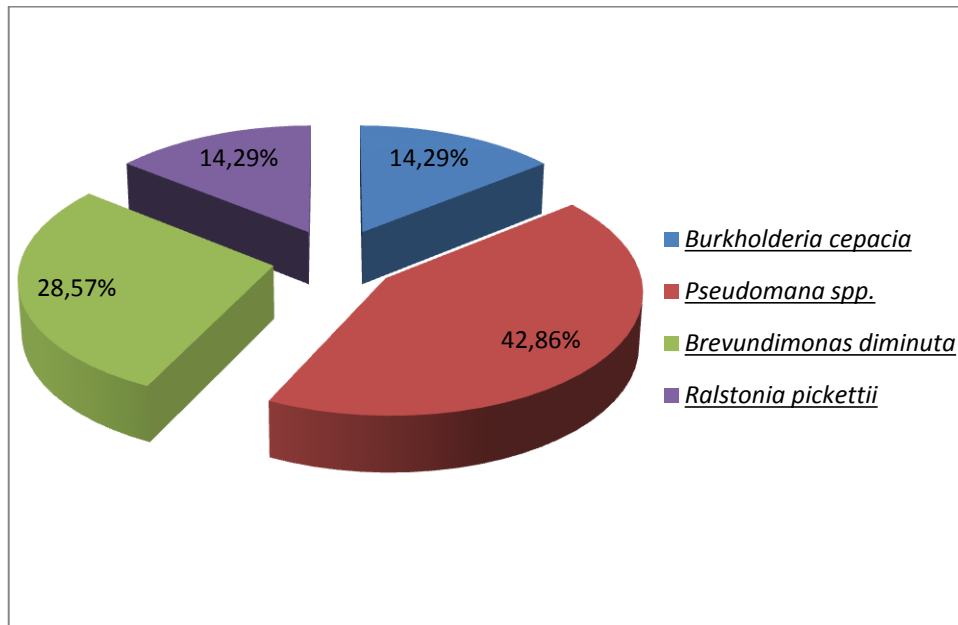


Gráfico 4-3: Porcentaje de bacterias cocos Gram positivos identificados de las muestras de agua potable y envasada de la ciudad de Riobamba.
Realizado por: Erika Vargas., 2015

En un estudio realizado por Vendrell, M. C y colaboradores, menciona que se estudió un total de 6 muestras recogidas de dos puntos situados en la fuente termal del Tinteiro (provincia de Ourense, España) y otros cuatro puntos en las inmediaciones de ésta, con el objeto de comprobar su posible contaminación bacteriológica, pues al ser agua de consumo público debe ser potable en su calidad de alimento. En este trabajo se ha determinado en los puntos muestreados la presencia de patógenos para humanos, del tipo *coliforme fecal*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Clostridium* sulfito-reductor, *Pseudomonas*, *Vibrio* y *Salmonella*, cuya presencia en aguas de consumo está prohibida por la Legislación Española. (Vendrell, M. C. et.al. 1998, <http://www.redalyc.org/pdf/724/72420205.pdf>)

Estudios similares como el realizado por Liliana, LÖSH y colaboradores muestran la presencia de bacterias en fuentes de agua de la provincia de Chaco (Argentina), donde se encontró bacterias como *E. coli* en 68 muestras, *Citrobacter* en 25 muestras, *Klebsiella* en 56 muestras y *Enterobacter* en 30 muestras. Al igual que en otro estudio realizado por el mismo autor en el mismo lugar se encontró 47 cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.

Un estudio realizado por Ryan, Michael y Adley Catalina indican que varios hospitales con brotes-en particular, en pacientes con fibrosis quística y con la enfermedad de Crohn infectados con *Ralstonia pickettii*. De los 55 casos reportados de infección, la mayoría se deben a soluciones contaminadas tales como agua, solución salina y medicamentos estériles. Esta contaminación se presenta cuando se fabrica el producto, ya que esta bacteria tiene la capacidad de pasar a través de filtros de 0,45 y 0,2 mm que se utilizan para esterilizar productos medicinales.

La importancia de *Pseudomonas* se tornó mayor cuando se comprobó su capacidad de inhibir los coliformes, siendo los indicadores de contaminación de agua más usados en el mundo, por lo tanto se corre un gran riesgo de consumir agua con índice de *coliformes* cero pero podrían estar inhibidos por *Pseudomonas* (MARCHAND, Edgard, cita a SOARES, 1996). Además, se ha comprobado que especies de los géneros *Pseudomonas*, *Sarcina*, *Micrococcus*, *Flavobacterium*, *Proteus*, *Bacillus*, *Actinomycetos* y levaduras son microorganismos que influyen en la detección del grupo *coliformes* ya que ejercen sobre éstos una acción inhibitoria (MARCHAND, Edgard, cita a GELDREICH, 1978).

Estudios efectuados por Roberts, NC y colaboradores (1982) reportaron que especies del género *Pseudomonas* producen una sustancia denominada "Pseudocin" (PLS) que inhibe el crecimiento de *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii* y *Klebsiella sp.* por lo que se considera que aun cuando las aguas tratadas muestren estar libres de coliformes no se puede asegurar su potabilidad (MARCHAND, Edgard, cita a ONTIVEROS, 1983).

3.6 Determinación de los perfiles de resistencia antimicrobiana de las bacterias aisladas e identificadas de muestras de agua potable y envasada de la ciudad de Riobamba.

En las bacterias que pertenecen a los bacilos gram negativos se utilizaron los discos de sensibilidad de: Ciprofloxacina (CIP 5µg), Gentamicina (CN 10µg), Meropenem (MEM 10µg), Ampicilina (AMP 10µg), Estreptomicon (S 300µg), Trimetoprim-Sulfametoxazol (SxT 25µg) y Minociclina (MH 30µg), mientras que en las bacterias cocos Gram positivos se utilizaron los discos de sensibilidad antes mencionados además de la Meticilina (ME 5µg) y se efectuó la técnica basada en el método de Bauer y colaboradores. (TAROCO, R, SEIJA, V. VIGNOLI, R., 2009, <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/BacteCEFA34.pdf>).

Los resultados del antibiograma del grupo de Bacilos Gram Negativos se exponen en la tabla 14-3, además de verificar en las tablas los límites de los diámetros de las zonas de inhibición

para cepas patrones según la NCCLS (Nacional Committee for Clinical Laboratory Standards), ya que se consideró que un halo de inhibición \leq a 26 milímetros se considera Resistente (R) y un halo de inhibición \geq 27 milímetros se considera Sensible (S).

A continuación se en la Tabla 14-3, se detalla los diámetros de las muestras de agua envasada y agua potable de la ciudad de Riobamba, con su respectiva interpretación, si presenta Resistencia se encuentra la letra R., y si presenta Sensibilidad con la letra S.

Tabla 14-3: Antibiograma de las bacterias identificadas del grupo de Bacilos Gram Negativos obtenidos de muestras de agua potable y envasada.

Muestra	Ciprofloxacina CIP 5 μ g	Gentamicina CN 10 μ g	Meropenem MEM 10 μ g	Ampicilina AMP 10 μ g	Estreptomicina S 300 μ g	Trimetoprim - Sulfametoxazol SxT 25 μ g	Minociclina MH 30 μ g
12 <i>Burkholderia cepacia</i>	32mm (S)	24mm (R)	34mm (S)	20mm (R)	32mm (R)	34mm (S)	Sin medir
15 <i>Pseudomonas spp.</i>	28mm (S)	28mm (S)	32mm (S)	20mm (R)	28mm (R)	32mm (S)	Sin medir
17 <i>Pseudomonas spp.</i>	33mm (S)	24mm (R)	30mm (S)	22mm (R)	30mm (R)	32mm (S)	Sin medir
18 <i>Pseudomonas spp.</i>	30mm (S)	24mm (R)	32mm (S)	19mm (R)	30mm (R)	28mm (S)	36mm (S)
21 <i>Brevundimonas diminuta</i>	38mm (S)	24mm (R)	22mm (S)	Sin halo (R)	30mm (S)	30mm (S)	25mm (R)
23 <i>Ralstonia pickettii</i>	28mm (S)	32mm (S)	36mm (S)	17mm (R)	38mm (S)	34mm (S)	40mm (S)
31 <i>Brevundimonas diminuta</i>	42mm (S)	26mm (R)	26mm (R)	Sin halo (R)	26mm (R)	30mm (S)	28mm (S)

Realizado por: Erika Vargas, 2015

Los porcentajes de resistencia y sensibilidad de cada antibiótico se expresa en la Figura 15-3 observando que la Ampicilina es el antibiótico que posee una resistencia del 100%, es decir que al combatir con este fármaco a cualquiera de las siete bacterias aisladas se producirá una falla terapéutica ya que no existirá acción farmacológica, seguido de Gentamicina y Estreptomicina con un porcentaje de resistencia de 71,43%, por lo tanto no existirá un certero efecto farmacológico frente a *Burkholderia cepacia*, *Brevundimonas diminuta* y *Pseudomonas spp.* y de

sensibilidad de 28,57%, mientras que de Minociclina existe una resistencia del 14,29% frente a *Brevundimonas diminuta*, sensibilidad de 42,86% y no se pudo medir el halo de inhibición en un 42,86% y Meropenem con una resistencia del 14,29% frente a *Brevundimonas diminuta* y finalmente Ciprofloxacina y Trimetroprim-Sulfametazol posee una sensibilidad del 100%, es decir que al combatir con estos fármacos a cualquiera de las siete bacterias identificadas se obtendrá una eficaz y eficiente terapia ya que existirá acción farmacológica.

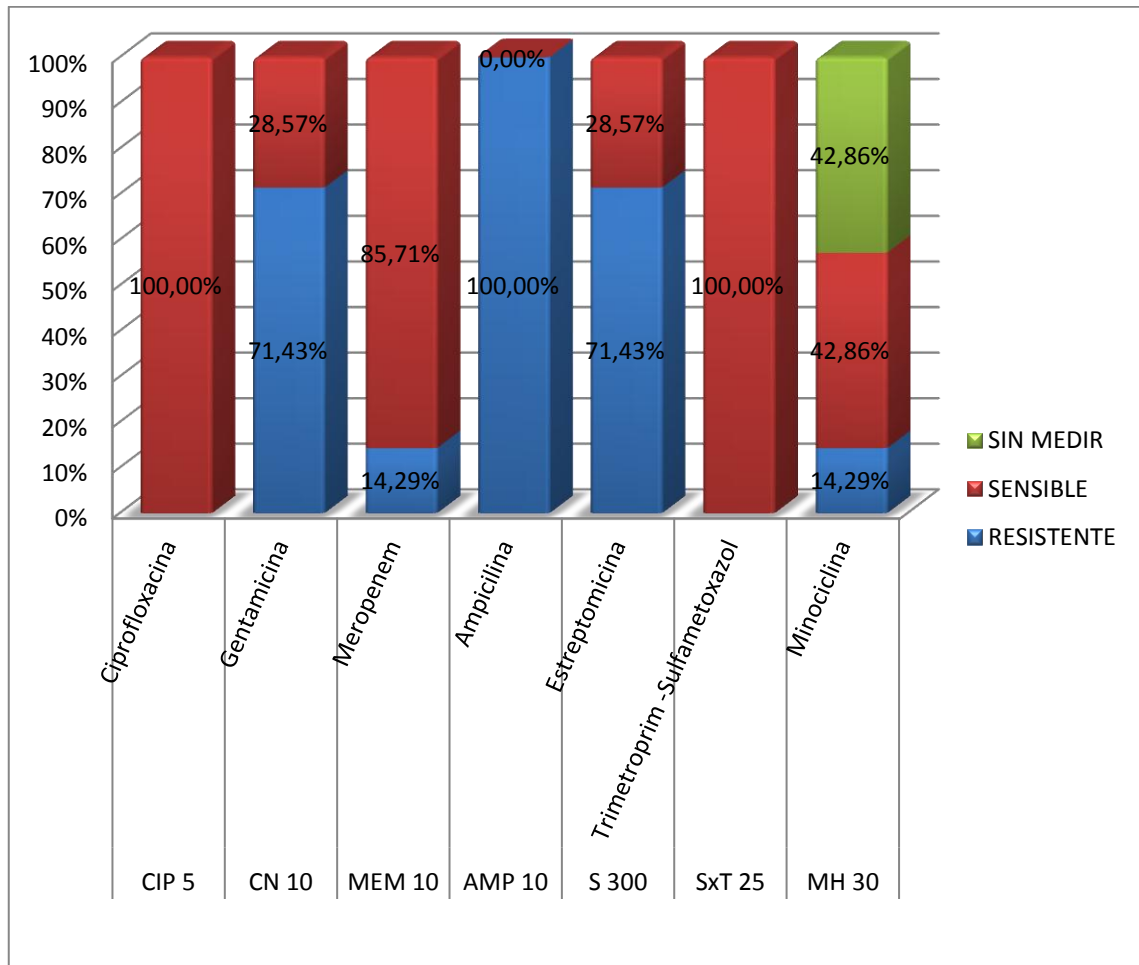


Gráfico 5-3: Porcentaje de Resistencia y Sensibilidad a los antibióticos en Bacilos Gram negativos aislados de muestras de agua potable y envasada de la ciudad de Riobamba.

Realizado por: Erika Vargas, 2015

Los resultados del antibiograma realizada a las bacterias identificadas dentro del grupo de los Cocos Gram Positivos se muestran en la tabla 15-3, además de verificar en las tablas los límites de los diámetros de las zonas de inhibición para sepas patrón según la NCCLS (Nacional Committe for Clinical Laboratory Standards), ya que se consideró que un halo de inhibición \leq a 26 milímetros se considera Resistente (R) y un halo de inhibición \geq 27 milímetros se considera Sensible (S).

A continuación se en la Tabla 15-3, se detalla los diámetros de las muestras de agua envasada y agua potable de la ciudad de Riobamba, con su respectiva interpretación, si presenta Resistencia se encuentra la letra R., y si presenta Sensibilidad con la letra S.

Tabla 15-3: Antibiograma de las bacterias identificadas del grupo de los Cocos Gram Positivos aislados de muestras de agua potable y envasada de la ciudad de Riobamba.

Muestra	Ciprofloxacina CIP 5µg	Gentamicina CN 10µg	Meropenem MEM 10µg	Ampicilina AMP 10µg	Estreptomycin S 300µg	Trimetoprim - Sulfametoxazol SxT 25 25µg	Minociclina MH 30µg	Meticilina ME 5µg
1 <i>Staphylococcus spp</i>	32mm (S)	24mm (R)	22mm (R)	20mm (R)	34mm (S)	38mm (S)	36mm (S)	Sin halo (R)
3 <i>Staphylococcus spp</i>	34mm (S)	13mm (R)	16mm (R)	17mm (R)	32mm (S)	15mm (R)	36mm (S)	Sin halo (R)
4 <i>Staphylococcus spp</i>	32mm (S)	22mm (R)	30mm (S)	20mm (R)	30mm (S)	32mm (S)	40mm (S)	Sin halo (R)
7 <i>Staphylococcus spp</i>	32mm (S)	30mm (S)	34mm (S)	23mm (R)	36mm (S)	24mm (R)	34mm (S)	Sin halo (R)
9 <i>Enterococcus</i>	30mm (S)	26mm (R)	30mm (S)	24mm (R)	32mm (S)	24mm (R)	34mm (S)	Sin halo (R)
10 <i>Micrococcus</i>	38mm (S)	26mm (R)	34mm (S)	44mm (S)	30mm (S)	30mm (S)	Sin medir	2mm (R)

Realizado por: Erika Vargas, 2015

Los porcentajes de resistencia y sensibilidad de cada antibiótico se expresa en la Figura 16-3 observando que la Meticilina es el antibiótico que posee una resistencia del 100%, es decir que al combatir con este fármaco a cualquiera de las siete bacterias identificadas se producirá una falla terapéutica ya que no existirá acción farmacológica, seguido de Ampicilina y Gentamicina con un porcentaje de resistencia de 85,71%, por lo tanto no existirá un certero efecto farmacológico frente a *Staphylococcus spp*, *Enterococcus*.y *Micrococcus* y una sensibilidad de 14,29%, mientras que de Trimetoprim-sulfametoxazol existe una resistencia del 42,86% frente a *Staphylococcus spp* y *Enterococcus*, y sensibilidad de 57, 14%, Meropenem con una resistencia del 28,57% frente a *Staphylococcus spp* y finalmente Ciprofloxacina, Estreptomycin

y Minociclina posee una sensibilidad del 100%, es decir que al combatir con estos fármacos a cualquiera de las siete bacterias identificadas se obtendrá una eficaz y eficiente terapia ya que existirá acción farmacológica.

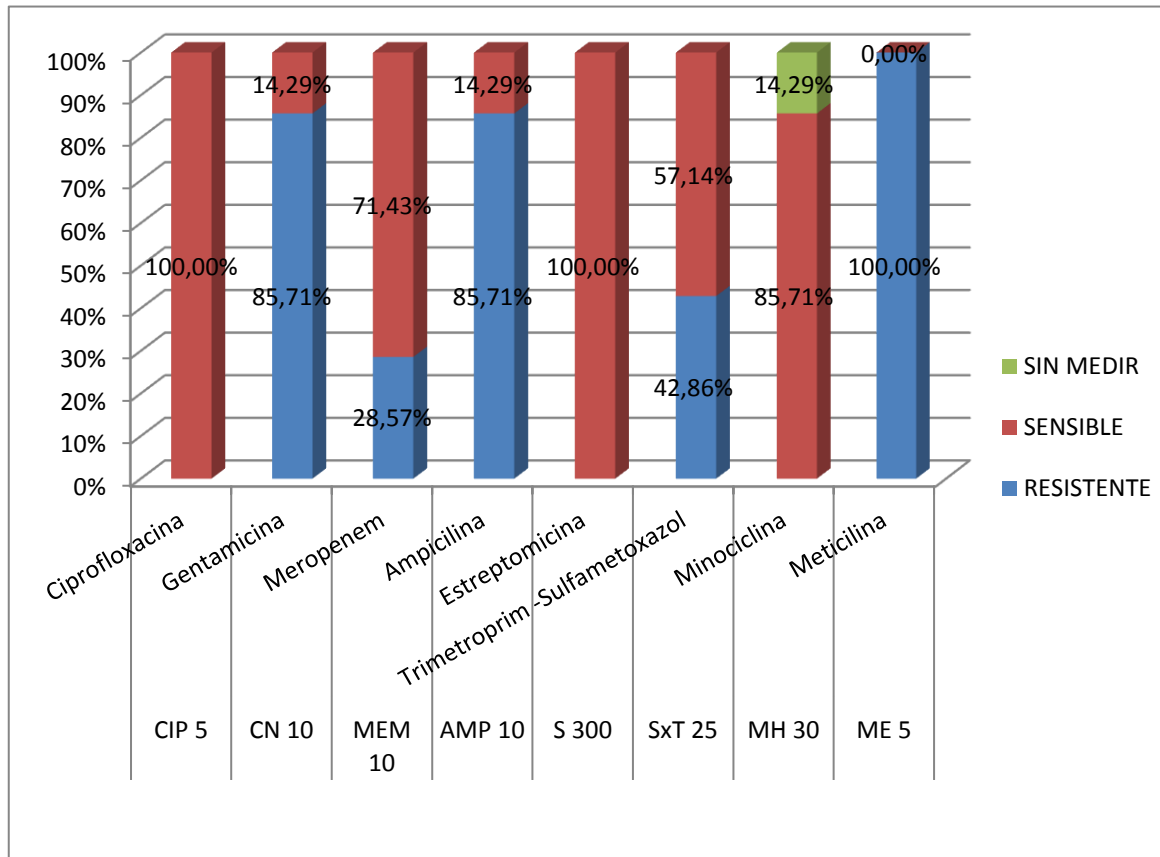


Gráfico 6-3: Porcentaje de Resistencia y Sensibilidad a los antibióticos en bacterias Cocos Gram Positivos aislados de muestras de agua potable y envasada de la ciudad de Riobamba

Realizado por: Erika Vargas, 2015

Estudios similares realizado por Liliana Lösh y colaboradores sobre susceptibilidad antimicrobiana de aislamientos de *Echerichia coli* de diversas fuentes de agua del Chaco (Argentina), obtuvieron en 4 aislamientos resistencia solamente a la ampicilina, de las cuales 2 provenían de fuentes subterráneas, 1 de red y la restante de fuente superficial. Otra publicación realizada por los mismos autores en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resalta que de las 47 cepas estudiadas 21,3% fueron resistentes a Gentamicina.

En una revista sobre medio Ambiente- Estudio sobre su fortaleza en aguas residuales Bacterias resistentes a antibióticos en medios acuáticos, indica que las muestras de agua recogidas en el río fue un punto de muestreo antes y después de cada vertido y dos puntos aguas abajo del último vertido, a diferente distancia, en los que se tomaron muestras tanto de agua como de

sedimento, durante el periodo de muestreo presentan un patrón de resistencia a los antibióticos dispar.

La Red Nacional de Resistencia Bacteriana de Ecuador (REDNARBEC), los últimos datos que reportan en el 2008, indica la resistencia a nivel comunitario de tetraciclina un 96% y a ampicilina 93% en *Shigella spp.*, un 30% a tetraciclina en *Salmonella spp.*, 71% a ampicilina y tetraciclina en *Escherichia coli*, un 30% a eritromicina y oxacilina un 25% en *Staphylococcus aureus*”. (QUIZHPE, 2011, p. 15).

En el caso de la cefalexina, el grupo bacteriano que presenta mayor porcentaje de resistencia es el de los coliformes totales, alcanzando en determinadas muestras valores de hasta el 100% después del vertido de antibióticos, aunque estos porcentajes van disminuyendo a lo largo del río al contrario de lo que pasaba con el número total de bacterias. En el caso de la amoxicilina, tanto los *coliformes totales* como *E. coli* muestran porcentajes de resistencia bastante elevados, decayendo también según se avanza en el curso del río.

No se encontraron *Enterococcus* resistentes salvo en el vertido de la EDAR. En el caso de los sedimentos los patrones son similares a los del agua: para cefalexina, las mayores resistencias se producen tras el vertido de antibióticos, disminuyendo a lo largo del curso del río, y el grupo bacteriano que mayor porcentaje de resistencias presenta es el de coliformes totales, mientras que para la amoxicilina, tanto *coliformes totales* como *E. coli* presentan elevada resistencia, disminuyendo en general a lo largo del curso del río. Tampoco se encontraron *Enterococcus* resistentes a amoxicilina en los sedimentos. (BÉCARES, Eloy, 2011, pp 36-38)

Un estudio realizado por CASTILLO, Liseth y colaboradores sobre el “Aislamiento y selección de *coliformes fecales* resistentes a antibióticos provenientes de dos plantas de tratamiento de aguas residuales de la ciudad de Puebla”, muestran de un ecosistema acuático se aislaron 23 cepas bacterianas, cuya identificación reveló la presencia de los géneros *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus Pseudomonas*, *Acinetobacter* y *Neisseria*.

Todas las cepas manifestaron resistencia a diferentes antibióticos los que incluyeron: CEF, KAM, CLOR, AMIK, NOR, CRO, CTX, PEN, ERI y a los metales pesados plomo, cromo y cadmio. En el 30,43 % de ellas se observó una ocurrencia conjunta de multirresistentes a los diferentes antibióticos y metales. Se evidenció la relación existente entre la resistencia a los químicos ensayados en la población bacteriana estudiada.

En Europa, el aumento de (VRE), resistencia a la vancomicina en diferentes especies de *Enterococcus* (causan infecciones post-quirúrgicas), ocasionada por el uso de avoparcina, un antibiótico promotor del crecimiento en animales. Un estudio ha verificado que raramente en la carne molida de cerdo y res ocurre VRE. Se ha verificado que en la acuicultura, el uso de oxitetraciclina causa un cambio estacional en las especies de bacteria hacia las Enterobacteriaceae, además de presentar un aumento en la resistencia a los antibióticos. (MEADE-CALLAHAN, 2001, http://www.actionbioscience.org/esp/evolucion/meade_callahan.html).

En Inglaterra y Gales, el número de defunciones ocasionadas por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) pasó de menos de 50 en 1993 a más de 1.600 en el año 2006. En el sudeste asiático, se calcula que un niño pierde la vida cada dos minutos por la acción de bacterias resistentes.

En un estudio dado a conocer en 2009, en un evento paralelo a la Asamblea Mundial de la Salud, se informaba que casi la mitad de los pacientes de un centro hospitalario de Uganda (28 de 62) no respondieron a los antibióticos disponibles, a causa de la resistencia bacteriana (86% de recién nacidos). Estos datos, de por sí alarmantes, se quedan cortos frente a la magnitud del problema, ya que la RBA va más allá de la prolongación de las enfermedades y el incremento de los costos de tratamiento. Su responsabilidad en los índices de mortalidad experimenta una tendencia al alza constante.

Además, La Resistencia Bacteriana a Antibióticos (RBA), es uno de los problemas de salud pública más preocupantes en el mundo. En América Latina, tal como en países depauperados de otras regiones, ha llegado a convertirse en una gran amenaza. Sin duda, el mal uso y el abuso de antibióticos son la causa directa, debido a factores como la alta prevalencia de enfermedades infecciosas, el incremento de la pobreza, el alto costo de los medicamentos, las tarifas de los servicios, la ausencia de controles de calidad, la venta libre de medicamentos en las tiendas y farmacias y la presión de la publicidad en los medios de comunicación, por lo que es muy importante reconocer a la RBA como un problema multicausal, de enorme complejidad.

Por lo tanto, los patógenos oportunistas que están presentes en el medio ambiente, pueden causar enfermedades a las personas cuyos mecanismos de defensa locales o generales son deficientes, por ejemplo a los ancianos, a los lactantes, quienes han sufrido quemaduras o heridas extensas, a los enfermos sometidos a un tratamiento inmunosupresor o a los que padecen el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Si el agua que esas personas utilizan para la bebida o el baño contiene un gran número de estos microorganismos

oportunistas puede producirles diversas infecciones cutáneas y de las membranas mucosas del ojo, oído, nariz y garganta. (OMS, 1995).

El sector agropecuario, así como la industria farmacéutica tienen una considerable responsabilidad en el incremento del consumo de antibióticos, ésta última por sus actividades no éticas de promoción y distribución de medicamentos. La RBA es un problema comunitario y hospitalario, dada la habilidad de las bacterias resistentes para diseminarse extensivamente a través de poblaciones humanas, animales, vegetales y otros elementos del medio ambiente, sin respetar límites geográficos ni políticos.

Pero el problema se vuelve mucho más grave aún, debido a la emergencia de nuevos mecanismos de resistencia bacteriana, haciendo que estas sean prácticamente inmunes a la acción antibiótica.

CONCLUSIONES

- Al tomar las 11 muestras de agua de consumo tanto potable como envasada se siguió protocolos que permitieron un muestreo y transporte adecuado según Antonio Guevara (1996), además de basarse en la Norma NTE INEN 2176: 2013 para una adecuada etiqueta en las muestras, que permitió una adecuada recolección de datos y verificación correcta del muestreo, asimismo se aseguró de una correcta toma de la muestra que es uno de los pasos de gran importancia para obtener resultados confiables en la investigación.
- Se cuantificó las bacterias heterótrofas aerobias mesófilas presentes en las muestras del agua de consumo, donde se observó que existió mayor presencia de bacterias en las muestras de agua envasada 45,45% (5 muestras) que en las muestras de agua potable 18,18% (2 muestras), dando un porcentaje total de crecimiento del 63,64% y sin crecimiento bacteriano en un total del 36,36% y de igual modo la cantidad de bacterias es notable siendo mayor en las muestras de agua envasada que en las muestras de agua potable, estas últimas llegan a contajes menores de 300 bacterias, esta diferencia de presencia y crecimiento se presume es responsable el cloro presente en las muestras de agua potable.
- Se aisló y purificó las colonias de bacterias heterótrofas aerobias mesófilas presentes en las muestras del agua de consumo, con ayuda de la técnica de estrías y la siembra en estrías por agotamiento por cuadrantes, es así que de las 11 muestras de agua de consumo resultaron 28 cajas de las que se aislaron 31 colonias, las características propias de cada cepa como es el color, tamaño, forma, ayudan a la selección para el aislamiento de las bacterias, y fueron de gran importancia la utilización de estos métodos para una purificación fácil y separar una masa de bacterias individuales en unidades que forman colonias.
- La caracterización macroscópica ayudó a seleccionar a las bacterias ya que existieron bacterias de color anaranjado, blancas y otras de color blanco cremoso, entre tamaños variados menores y mayores a un milímetro, incluso de difícil crecimiento, mientras que la caracterización microscópica de los aislados bacterianos encontrados se realizó con la observación en el microscopio de la tinción Gram de las 31 bacterias obteniendo un 42%

de Cocos Gram Positivos al igual de Bacilos Gram Negativos e incluso un 16% de hongos.

- Se identificaron taxonómicamente los microorganismos aislados obteniendo de las 11 muestras de agua estudiada, 32 aislamientos de los cuales se identificaron a 13 cepas puras, y para la identificación se dividieron a los bacilos gram negativos y a los cocos Gram positivos para sus respectivas pruebas microbiológicas, por lo tanto al grupo de los Cocos Gram Positivos de seis cepas puras, al realizar las pruebas como oxidasa, catalasa, coagulasa, siembra en manitol salado y sensibilidad a la Noboviocina se pudo obtener una identificación de *Pseudomona spp.* en un 42,86%, *Burkholderia cepacia* y *Ralstonia pickettii* un porcentaje similar de 14,29% y *Brevundimona diminuta* en un 28,57%.

Mientras que al grupo de los Bacilos Gram Negativos de siete cepas puras, al realizar las clásicas pruebas bioquímicas como oxidasa, catalasa, siembra en urea, Simmons Citrato, SIM donde se observa movilidad y reacción al indol, Kligler donde se observa reacciones de alcalinidad y acidez, presencia de SH₂, y CO₂, se pudo observar una identificación de *Pseudomona spp.* en un 42,86%, *Burkholderia cepacia*, y *Ralstonia pickettii* en un porcentaje similar a 14,29% y finalmente un 28,57% de *Brevundimona diminuta*, la identificación se realizó con ayuda de tablas de comparación bacteriológica disponibles en manuales de técnicas en microbiología clínica.

- Al determinar los perfiles de resistencia antimicrobiana de las bacterias identificadas mediante el método de Kirby-Bauer, y con la ayuda de las tablas de los límites de los diámetros de las zonas de inhibición para sepas patrón según la NCCLS (Nacional Committee for Clinical Laboratory Standards), como referencia, además del uso de un patrón de las zonas de halo para bacterias resistentes, se observó un 100% de resistencia a Ampicilina 10µg, 5 de ellas resistentes a Gentamicina 10µg y Estreptomina 300µg (71,43%), 1 resistente a Minociclina 30µg y Meropenem 10µg (14,29%), a Ciprofloxacina 5µg y Trimetoprim-Sulfametazol 25µg tienen una sensibilidad del 100%.

Mientras que de las 6 colonias Cocos Gram positivos se observó una resistencia del 100% a Metilina 5µg, 6 de ellas resistentes a Ampicilina 10µg y Gentamicina 10µg (85,71%), 3 resistentes a Trimetoprim-Sulfametazol 25µg (42,86%) y 2 resistentes a Meropenem 10µg (28,57%), a Minociclina 30µg, Ciprofloxacina 5µg y Estreptomina 300µg poseen una sensibilidad del 100%.

El hallazgo de un elevado porcentaje de resistencia a Ampicilina seguido de Gentamicina y Estreptomina en bacterias bacilos Gram negativos y una resistencia alta a Meticilina seguido de la Ampicilina y Gentamicina en bacterias cocos Gram positivos, en estas cepas provenientes del agua de consumo pone en evidencia la presión antibiótica selectiva que estaría ejerciendo sobre las mismas y/o la diseminación de genes de resistencia entre las poblaciones bacterianas, por lo que se afirma la necesidad de extender la red de vigilancia de la resistencia antimicrobiana a contaminantes del agua y el suelo.

Por otra parte, la presencia de indicadores de contaminación en aguas emvasadas provenientes de fuentes naturales minerales y de los sistemas de almacenamiento en aguas de red determina la necesidad de implementar medidas para el control del correcto proceso de desinfección del agua y del adecuado almacenamiento (cisternas), por el riesgo que implica para la salud de aquellos que la consumen.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar el aislamiento y purificación de las bacterias a estudiar de manera fiable ya que de ello depende la correcta identificación, además de que puede variar los resultados a la hora de realizar las pruebas microbiológicas y alejarnos de la identificación bacteriana
- Se recomienda que si la muestra se recoge de una red de distribución de agua, se añada tiosulfato de sodio (0,1 mL de una solución al 10% de tiosulfato de sodio por cada 100 mL de agua), con el fin de neutralizar el cloro residual que puede estar presente en la muestra e impedir de esta manera, que continúe ejerciendo su acción bacteriológica y disminuya o elimine la oportunidad de detectar los microorganismos que podrían indicar una posible contaminación del agua.

BIBLIOGRAFÍA

ALBAREZ BENITO, Victoria.; BOQUET JIMENEZ, Ernesto & FEZ CAMINO, Isabel. *Manual de Técnicas en Microbiología Clínica.* 2ª ed. Madrid-España. Latinoamericana, 1995. pp 24-31-33-34-115-116-118-127-130-133-134-135-140-141-227-228.

ALONSO, A.; SÁNCHEZ, P.; & MARTINEZ, J. Environmental selection of antibiotic resistance genes. *Environmental Microbiology*, Vol. 3, (2001), pp. 1-9.

AMOS, Gregory. et al. Validated predictive modelling of the environmental resistome. *The ISME Journal-Sociedad Internacional de Ecología Microbiana*, Vol 4. 13 febrero 2015. pp. 67-76.

APARICO RAMOS, Lizeth y LADINO SOLITO, Oscar, Evaluación de la calidad microbiológica y físico-química de aguas envasadas en bolsas distribuidas en el área metropolitana de San Salvador en el periodo de septiembre – octubre de 2007. [En línea] (TESIS). (Pregrado). Licenciatura en Química y Farmacia, Universidad de el Salvador. San Salvador – El Salvador. 2011. pp- 48-50. [Consulta: 15 septiembre 2015]. Disponible en: <http://ri.ues.edu.sv/494/1/10136845.pdf>.

APAZA, R. & GARCÍA, M. *Resistencia a los Antibióticos.* [en línea]. 2013. Colombia [Consulta: 17 agosto 2015]. Disponible en: [http://www.almageriatria.info/pdf_files/col_09/alumnos_3/Marco%20A.%20Garcia-%20Colombia-%20RESISTENCIA_MICROBIANA-2%20\(2\).pdf](http://www.almageriatria.info/pdf_files/col_09/alumnos_3/Marco%20A.%20Garcia-%20Colombia-%20RESISTENCIA_MICROBIANA-2%20(2).pdf).

AQUASALUD. Monraval i Grau SL. [Blog]. 2003. [Consulta: 07 agosto 2015] Disponible en: <http://www.aquasalud.com/descalcificación>.

ASHBOT, N. Methods to identify and enumerate frank and opportunistic bacterial pathogens in water and biofilms. *World Health Organization*, Vol. 7. (2003). pp. 146-176

BÉCARES, E., MARTÍN, J. & SIDRACH-CARDONA, R., "Bacterias resistentes a antibióticos en medios acuáticos". [en línea]. 2011. [Consulta: 2015-08-17] Disponible en: https://www.fundacionmapfre.org/documentacion/publico/i18n/catalogo_imagenes/grupo.cmd?

path=1065555.

BRIAN, H. *How to Survive in the bush, on the coast, in the mountains of New Zealand.* Wellington. Government Printe. 1962. pp. 34-40

CAJAMARCA BERREZUETA, Byron & CONTRERAS ÁLVAREZ, Luis, Control microbiológico del agua potable de uno de los sistemas de abastecimiento del cantón Cuenca, a través de microorganismos indicadores. [En línea]. (TESIS). (Posgrado). Escuela de Bioquímica y Farmacia. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad de Cuenca. Cuenca-Ecuador. 2011. [Consulta: 20 agosto 2015]. Disponible en: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/2450/1/tq1094.pdf>.

CARBAJAL AZCONA, Ángeles. & GONZÁLEZ FERNÁNDEZ, María. Propiedades y funciones biológicas del agua. *Universidad Complutense de Madrid. Departamento de Nutrición. Facultad de Farmacia.* [en línea]. 2012. (España). pp 33-45. [Consulta: 20 agosto 2015]. ISBN: 978-84-00-09572-7. Disponible en: <https://www.ucm.es/data/cont/docs/458-2013-07-24-Carbaljal-Gonzalez-2012-ISBN-978-84-00-09572-7.pdf>

CARBAJAL AZCONA, Ángeles. & GONZÁLEZ FERNÁNDEZ, María.. *Funciones biológicas del agua en relación con sus características físicas y químicas,* Barcelona- España. 2003. pp. 56.

CASTILLO, Liliana. et. al. *Aislamiento y selección de coliformes fecales resistentes a antibióticos provenientes de dos plantas de tratamiento de aguas residuales de la ciudad de Puebla.* España. 2009. [Consulta: 22 agosto 2015]. Disponible en: http://www.researchgate.net/publication/228328393_Antibiotic_and_metals_resistance_in_bacteria_isolates_from_Almendares_River

CUTIMBO TICONA, César. Calidad bacteriológica de las aguas subterráneas de consumo humano en centros poblados menores de la Yarada y los Palos del distrito de Tacna. [En línea] (TESIS) (posgrado). Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann de Tacna, Facultad de Ciencias. Microbiología. Tacna-Perú. 2013. [Consulta: 22 agosto 2015]. Disponible en: http://tesis.unjbg.edu.pe:8080/bitstream/handle/unjbg/158/45_2013_Cutimbo_Ticono_CA_FAC_I_Biologia_Microbiologia_2012_resumen.pdf?sequence=2.

DORLAND, D. M. *Antimicrobianos.* 2º ed. Madrid- España. McGraw-Hill Interamericana. 1993. pp 67.

EFE. EEUU ANTIBIÓTICOS. [blog]. Ecuador. 2014. [Consulta: 30 agosto 2015]. Disponible en: http://ecuador.servidornoticias.com/24_salud/2518829_la-oms-advierte-sobre-la-creciente-resistencia-a-los-antibioticos.html.

EL UNIVERSAL. *Bacterias del suelo contribuyen al desarrollo de resistencia a antibióticos.* Salud. [blog]. Caracas- Venezuela. 30 de agosto 2012. [Consulta: 26 junio 2015]. Disponible en: <http://www.eluniversal.com/vida/120830/bacterias-del-suelo-contribuyen-al-desarrollo-de-resistencia-a-antibio>

GARCÍA, L., *Capítulo 1: Descripción del proceso de producción de agua embotellada.* [en línea]. 2011. [Consulta: 24 junio 2015]. Disponible en: www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/.../04-CAPITULO-1.doc

GIRÓN, W., *Antimicrobianos-Revisión de antibioticos por alumno fcm.* [blog]. 2008. [Consulta: 07 agosto 2015]. Disponible en: <http://es.scribd.com/doc/269814351/revision-de-antibioticos-por-alumno-fcm>

GOÑI-URRIZA, M., CAPDEPUY, M. & ARPIN, C., Impact of an Urban Effluent on Antibiotic Resistance of Riverine Enterobacteriaceae and Aeromonas spp.. *Applied and Environmental Microbiology.* Vol. 66. N° 1. (2006). pp. 125-132.

GUEVARA, Antonio. *OPS/CEPIS. Control de Calidad del Agua. Métodos de análisis para la evaluación de la calidad del agua.* [línea]. 1996. Lima-Perú. pp. 10-11. [Consulta: 07 septiembre 2015]. Disponible en: <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/scan2/031279/031279.pdf>.

HENRIQUES, I. et. AL., Analysing diversity among betalactamase encoding genes in aquatic environments. *FEMS Microbiol. Ecol.,* Issue 56. 2006. pp. 418-429.

HIRATA, T. et al. Removal efficiencies of microorganisms in wastewater treatment processes. *Water Science Technology.* Vol.7. Núm 28. 2003. pp. 55-61

INNOVAQUA, *Filtración Ultravioleta.* [blog]. 2011. [Consulta: 07 agosto 2015]. Disponible en: <http://www.innovaqua.com/productos/uv.html>.

KONEMAN, E. et. al. *Enterobacteriaceae- Diagnóstico Microbiológico. Texto y Atlas Color.* Buenos Aires- Argentina. Médica Panamericana. 1999. Pp 3

KÜMMERER, K., Resistance in the environment. *J. Antimicrob. Chemother*, Issue 54. 2004 pp. 311-320.

LANSING, M., PRESCOTT, J., HARLEY, D. & KLEIN, A.,. *MICROBIOLOGÍA*. 5ª ed. Madrid- España. McGRAW HILL. 2002. Pp. 23.

LÖSCH, L. & MERINO, L. A. Susceptibilidad antimicrobiana de aislamientos de *Escherichia coli* provenientes de diversas fuentes de agua del Chaco (Argentina). *Higiene y Sanidad Ambiental*. Vol. 12. N° 4. 2012. pp. 913-917.

LöSCH, L., MERINO, L. & ALONSO, J. Estudio del perfil de sensibilidad antibiótica en especies de la Familia Enterobacteriaceae aisladas de fuentes de agua de la provincia del Chaco. *Universidad Nacional del Noreste Comunicaciones Científicas y Tecnológicas*. [en línea]. 2006. [Consulta: 07 agosto 2015]. Disponible en: <http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/cyt2006/03-Medicas/2006-M-022.pdf>.

LöSCH, L., MERINO, L. & ALONSO, J. M., 2004. Resistencia antimicrobiana en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de fuentes de agua de la provincia del Chaco (Argentina).. *Universidad Nacional del Nordest. Instituto de Medicina Regional*. pp. 1-3.

MARTÍNEZ, A. et. al. Resistencia a antibióticos y a metales pesados en bacterias aisladas del río Almandares. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*. Vol 41. N° 5. 2010. pp. 1-10.

MARTÍNEZ, J., The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. *Proc. R. Soc.* 2009. pp. 21-30.

MEADE-CALLAHAN, M. J. . *Los Microbios: Cómo funcionan y cómo los cambian los antibióticos*. [en línea]. 2001. [Consulta: 07 agosto 2015]. Disponible en: http://www.actionbioscience.org/esp/evolucion/meade_callahan.html.

MICROBIOLOGY, Products.. *3M Placas Petrifilm™ para el Recuento de Aerobios*. [Blog]. 2004 [Consulta: 24 agosto 2015]. Disponible en: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/PetrfilmAerobiccount_19100.pdf

MICROSALUD, Docencia. 2010. [Blog]. [Consulta: 14 junio 2015]. Disponible en: http://www.microsalud.us.es/web/docencia/grado/temas-comunes-grado/clasificacion_antimicrobianos.pdf

MORENO, M., *Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.* [Blog]. 2014. [Consulta: 15 septiembre 2015]. Disponible en: <http://es.slideshare.net/HansJc/mecanismo-de-accin-de-los-antibioticos>.

NEIRA, A., *Dureza en aguas de consumo humano y uso industrial, impactos y medidas de mitigación, estudio de caso: Chile.* [Blog]. [Consulta: 01 julio 2015]. Disponible en: http://repositorio.uchile.cl/tesis/uchile/2006/neira_m/sources/neira_m.pdf

NTE INEN, 2176:2013. *Agua. Calidad del agua. Muestreo. Técnicas de muestreo.* [en línea]. 2013. [Consulta: 26 junio 2015]. Disponible en: www.normalizacion.gob.ec/

OMS. *Guías para la calidad del agua potable.* [Blog]. 2006. [Consulta: 08 agosto 2015]. Disponible en: <http://www.slideshare.net/piyar/guia-calidad-aguapotablepdf-1>

OMS, *Guías para la calidad del agua potable- Aspectos Microbiológicos.* [Blog]. 2006. [Consulta: 07 agosto 2015]. Disponible en: http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3_es_7_fig.pdf?ua=1

OMS., *Combatamos la resistencia a los antimicrobianos- Si no actuamos hoy, no habra cura mañana.* [Blog]. 2011. [Consulta: 20 agosto 2015]. Disponible en: <http://www.who.int/world-health-day/2011/world-health-day2011-brochure-es.pdf>.

OMS., *Centro de Prensa.* [Blog]. 2014. [Consulta: 22 junio 2015]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/es/>

OMS., *Organización Mundial de la Salud.* [Blog]. 2015. [Consulta: 10 octubre 2015]. Disponible en: http://www.who.int/water_sanitation_health/diseases/diseasefact/es/

OMS, ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. *Guías para la Calidad del Agua Potable.* 3° Ed. Genova. 2004. Pp. 29

PELCAZAR, J., REID, R. & CHAN, E., *Microbiología.* 2ª Ed. Naucalpan de Juárez-México. McGRAW-HILL. 1982. Pp. 57.

PNUMA, *Prespectivas de Medio Ambiente Mundial.* [Blog]. 2007. [Consulta: 12 junio 2015]. Disponible en: http://app1.semarnat.gob.mx/dgeia/informe_12/06_agua/cap6_1.html

POLLACK, M., *Pseudomans Aeruginosa- Enfermedades Infecciosas. Principios y Práctica.* Buenos Aires- Argentina. 1997. Médica Panamericana. pp. 54

QUIZHPE, Arturo. *ReAct.* [en línea]. 2011. [Consulta: 22 junio 2015]. Disponible en: <http://www.reactgroup.org/uploads/who-we-are/rla/RLA-recuperar-la-salud.pdf>

QUIZHPE, Arturo et. al., *Uso Apropiado de antibióticos y Resistencia Bacteriana.* Cuenca-Ecuador. 2014. Gráficas del Autro. pp. 1-168.

REASONER, D. J. *Curso de certificación de microbiología (OPS).* [en línea]. 1998. [Consulta: 02 julio 2015]. Disponible en: <http://www.bvsde.paho.org/bvsala/e/fulltext/agentes/agentes.pdf>

ROJAS, Tomás, et. al., Bacilos gramnegativos no fermentadores en agua embotellada: susceptibilidad antimicrobiana y formación de biopelículas. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología RSVM,* 2014, Núm. 34. pp 64-69. [Consulta: 02 julio 2015]. Disponible en: http://www.researchgate.net/profile/Tomas_Faraco/publication/274070114_Bacilos_gramnegativos_no_fermentadores_en_agua_embotellada_susceptibilidad_antimicrobiana_y_formacin_de_biopelculas/links/551402310cf23203199cd1ea.pdf.

SEMARNAT. *Informe de la Situación del Medio Ambiente en México - Compendio de Estadísticas Ambientales Indicadores Clave y de Desempeño Ambienta.* [En línea] 2012. [Consulta: 02 julio 2015]. Disponible en: http://app1.semarnat.gob.mx/dgeia/informe_12/06_agua/cap6_1.html

SOTOMAYOR COBOS, Jorge. Análisis de la concentración de microorganismos en el agua para consumo humano, en San Cristóbal, Provincia de Galápagos – Ecuador. [En línea]. (TESIS) (Posgrado). Universidad San Francisco de Quito. Colegio de ciencias Biológicas y Ambientales. 2014. [Consulta: 03 septiembre 2015]. Disponible en: <http://es.ecomarytierra.org/wp-content/uploads/2015/01/An%C3%A1lisis-microbiologico-del-agua-en-San-Crist%C3%B3bal.pdf>.

TAROCO, R, SEIJA, V. VIGNOLI, R. Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica, *Temas de Bacteriología y Virología Médica.* [En línea]. 2009. [Consulta: 28 junio 2015]. Disponible en: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/BacteCEFA34.pdf>

TESACUA, S.. *Tratamiento de Agua.* Madrid-España. 2000. Rivas-Vaciamadrid. pp. 89

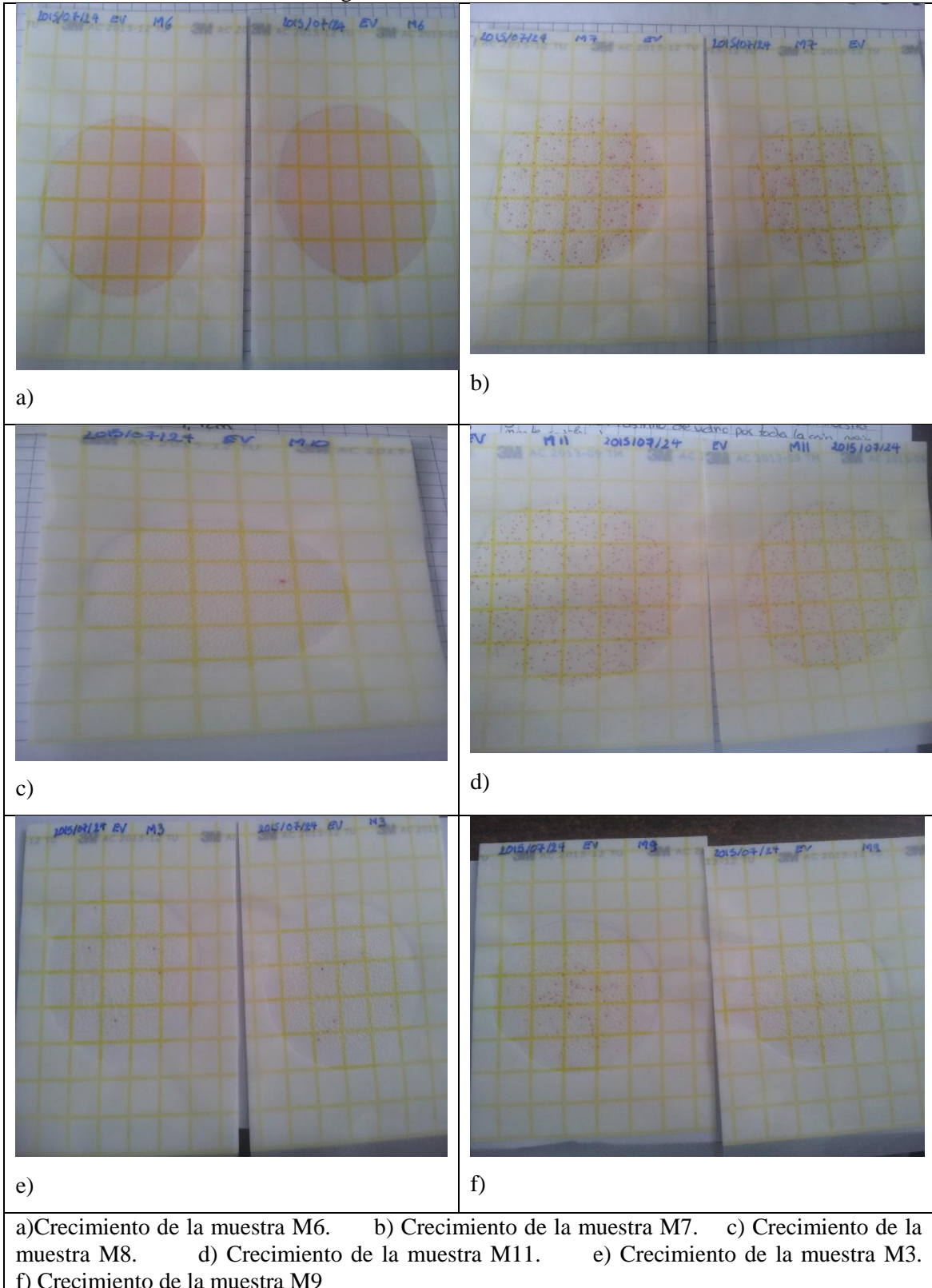
URG, UNIVERSIDAD DE GRANADA. Técnicas de cultivo. Aislamiento. Obtención de cultivos puros. Prácticas online de Microbiología para farmacéuticos. [En línea]. [Consulta: 20 agosto 2015]. Disponible en: <http://www.pomif.com/pages/practicas/bacteriologia/aislamiento>.

VILLEGAS JIMÉNEZ, Verónica., *Análisis físico-químico y microbiológico de aguas envasadas en funda consumidas masivamente en el Cantón Shushufindi, Provincia Sucumbíos variando las condiciones de almacenamiento.* [En línea]. (Tesis de grado). Universidad Central del Ecuador. Química Farmaceutica. Facultad de ciencias Químicas. Mayo, 2013. [Consulta: 20 noviembre 2014]. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/1893/1/T-UCE-0008-25.pdf>

WHO, W. H. O., *Guidelines for drinking-water quality.* 2ª Ed. Geneva. 2004. pp. 420

ANEXOS

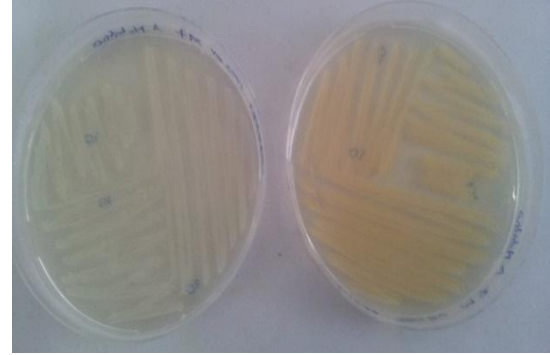
Anexo A: Crecimiento microbiológico en las Placas de Petrifilm



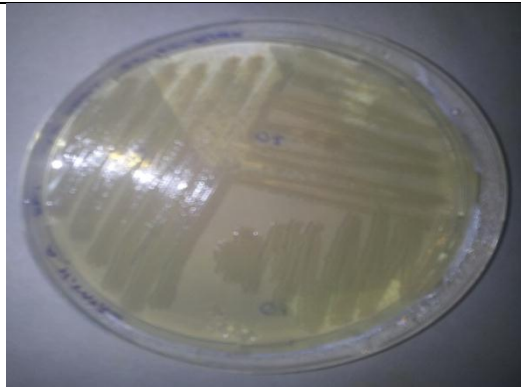
Anexo B: Aislamiento de las bacterias en cajas Petri con Agar Nutritivo.



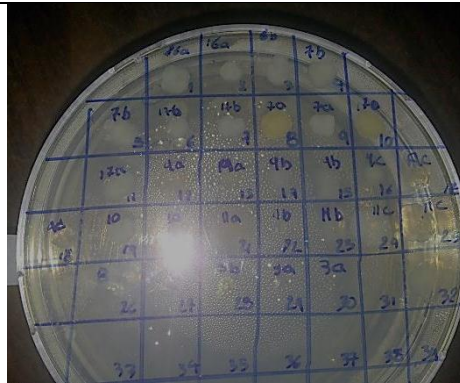
a)



b)



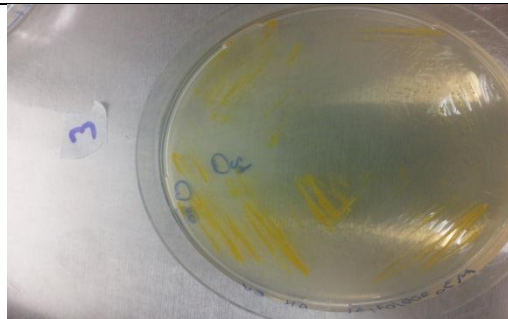
c)



d)



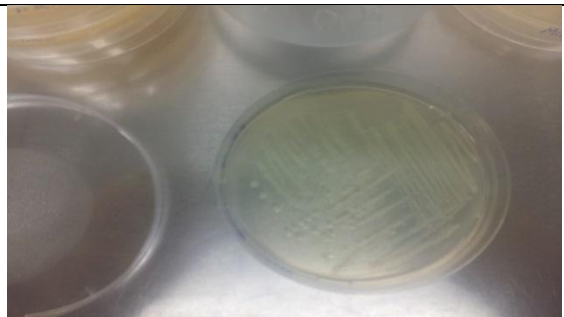
e)



f)



g)



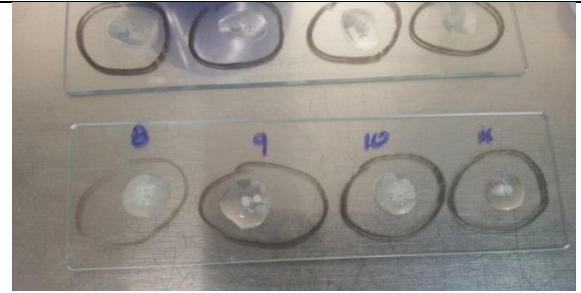
h)

a) Selección de las bacterias de las Placas de Petri Film. b) y c) Aislamiento mediante estrías de las bacterias en Agar Nutritivo. d) Purificación de bacterias aisladas de las placas de agar Nutritivo. e), f) g) y h) Crecimiento de las bacterias mediante estrías por agotamiento muestra M6, M3, M8 y M7 respectivamente.

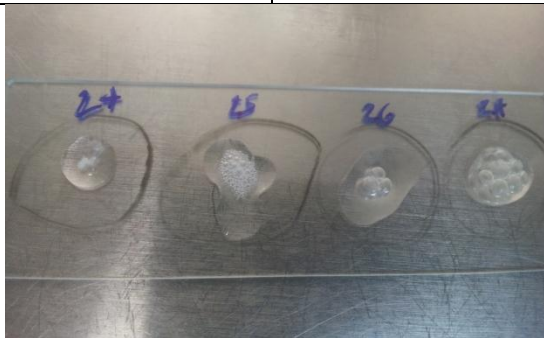
Anexo C: Prueba de la Catalasa



a) Prueba de la catalasa en la muestra 1, 2 y 3



b) Prueba de la catalasa en la muestra 8,9,10 y 11

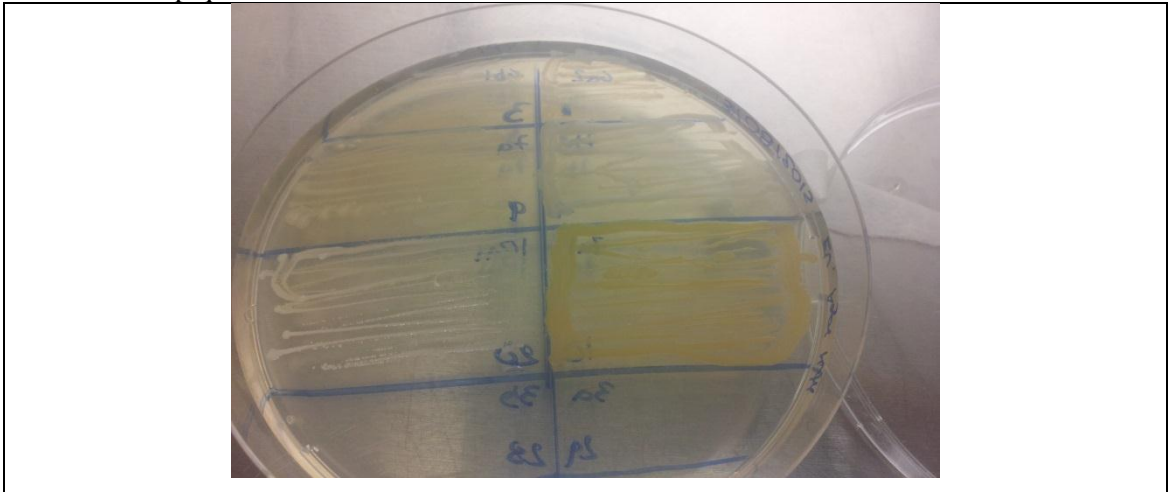


c) Prueba de la catalasa en la muestra 24, 25, 26 y 27

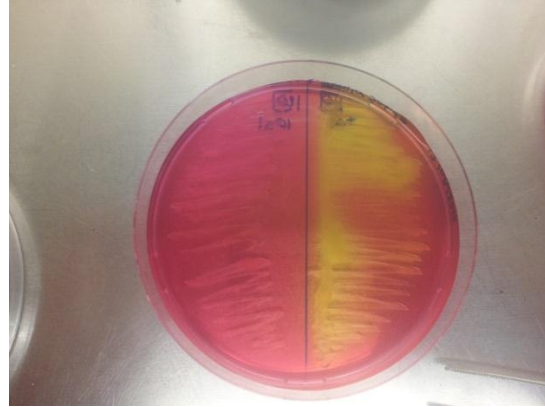
Anexo D: Prueba de la Oxidasa



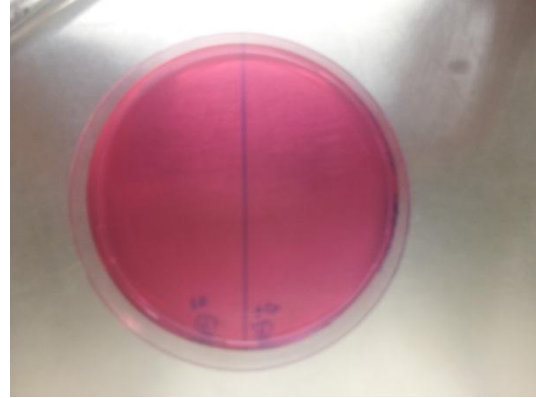
Anexo E: Repique de las colonias Cocos Gram Positivos



Anexo F: Siembra en Manitol Salado de las muestras de Cocos Gram Positivos.



a) Crecimiento de la muestra M10 (izquierda) y crecimiento y fermentación de la muestra M7 (derecha)



b) Sin crecimiento en agar Manitol Salado

Anexo G: Prueba de Coagulasa en las muestras de Cocos Gram Positivos



a) Prueba Negativa de Coagulasa en tubo

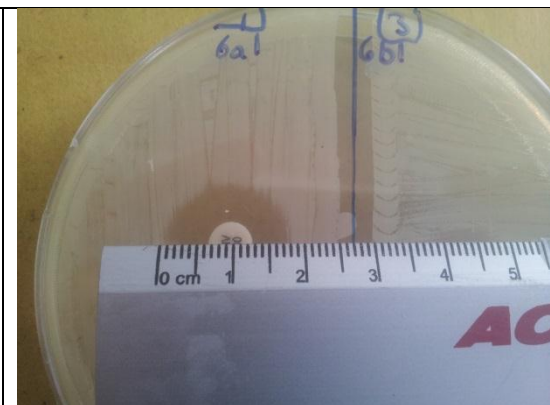


b) Prueba Negativa de Coagulasa en placa

Anexo H: Prueba de la Sensibilidad a la Novobiocina (5 μ g).en muestras de Cocos Gram Positivos



a) Crecimiento e inhibición al disco de Novobiocina 5 μ g



b) Medición del halo de inhibición

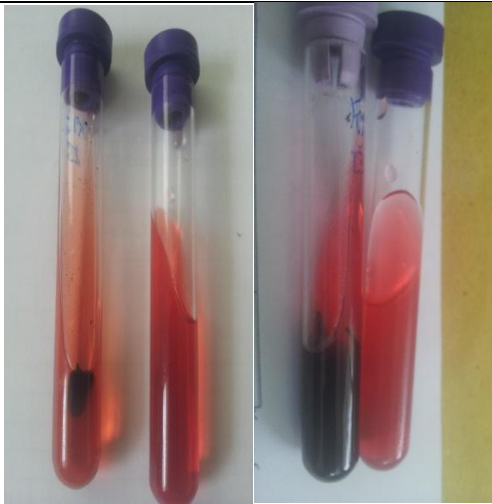
Anexo I: Pruebas bioquímicas realizadas a las cepas de Bacilos Gram Negativos



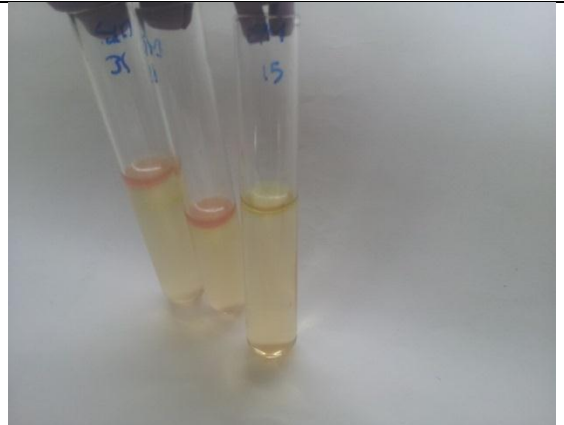
a) Prueba de Simmons Citrato Negativa tubo izquierdo y Positiva tubo derecho



b) Prueba de Kligler positivo para lactosa y presencia de CO2



c) Prueba de Kligler negativo y con presencia de HS2



d) Prueba de Indol: presencia en la superficie de un círculo rosa positivo en los dos primeros tubos, el tercero negativo sin círculo

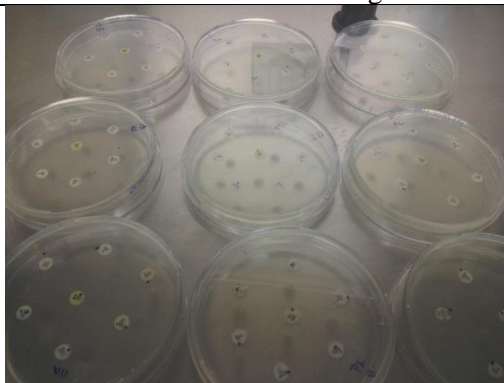


e) Prueba de Urea Positiva tubo izquierdo, Negativa tubo derecho

Anexo J: Estandarización de la carga bacteriana con el McFarland



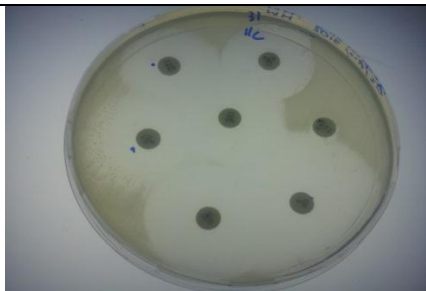
Anexo K: Realización del antibiograma



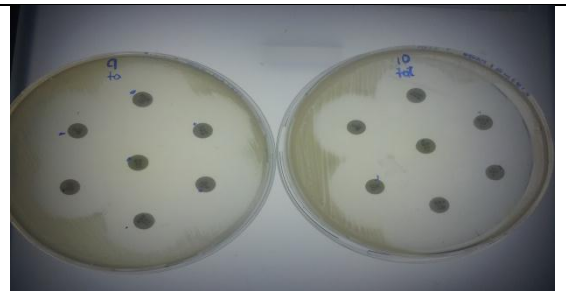
a) Placas después se siembran y colocar los discos de sensibilidad.



b) Crecimiento e inhibición de los discos muestra 21(izquierda), muestra 23 (derecha).



c) Crecimiento e inhibición de la muestra 11



d) Crecimiento e inhibición de la muestra 9(izquierda), muestra 10 (derecha).

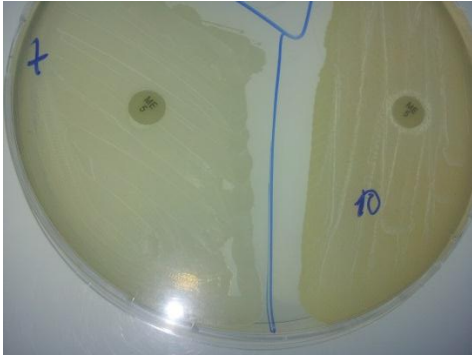


e) Crecimiento e inhibición de la muestra 7(izquierda), muestra 3 (derecha).



f) Crecimiento e inhibición de la muestra 1.

Anexo L: Crecimiento e inhibición de disco de Meticilina



a) Muestra 7 parte izquierda de la placa y Muestra 10 parte derecha.



b) Muestra 9 parte izquierda de la placa y Muestra 3 parte derecha

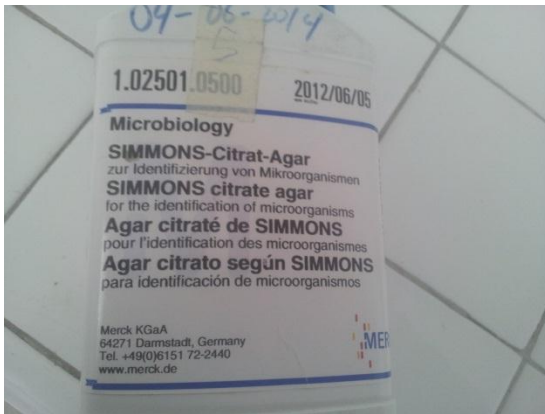
Anexo M: Filtro utilizado para filtrar la Urea



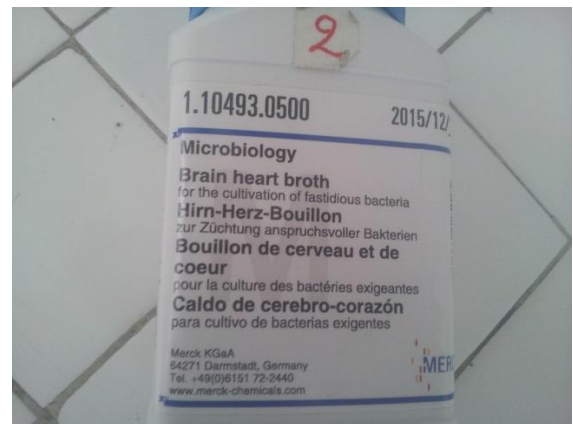
Anexo N: Tiras de Oxidasa



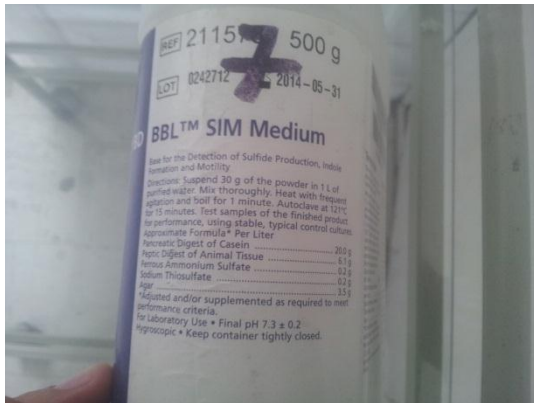
Anexo O: Medios de Cultivo utilizados



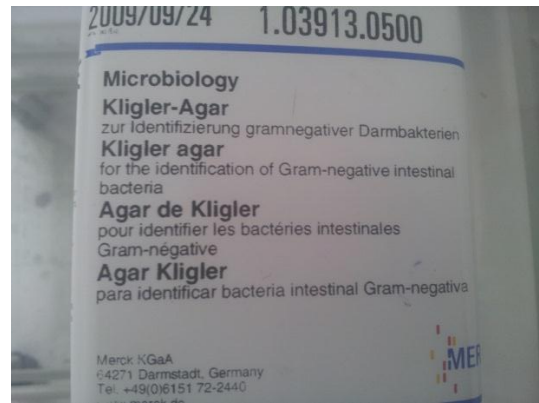
a) Agar Simmons Citrato



b) Caldo Cerebro Corazón



c) Medio semisólido SIM



d) Agar Kligler



e) Agar Nutritivo



f) Agar Cetrimide