



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

**“EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA DE LA FUENTE EL EJIDO
PERTENECIENTE AL CANTÓN GUANO, PROVINCIA DE
CHIMBORAZO”.**

Trabajo de titulación presentado para optar por el grado académico de:

BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

AUTORA: LAURA CECILIA TIERRA MACAS

TUTOR: Dr. GERARDO EMILIO MEDINA RAMIREZ

RIOBAMBA- ECUADOR

2017

©2017, Laura Cecilia Tierra Macas

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

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

El tribunal de Titulación certifica que: El trabajo de investigación: **“EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA DE LA FUENTE EL EJIDO PERTENECIENTE AL CANTÓN GUANO, PROVINCIA DE CHIMBORAZO”** de responsabilidad de la señorita egresada Laura Cecilia Tierra Macas, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Titulación, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Dr. Gerardo Medina
DIRECTOR DE TESIS

.....

.....

Dra. Sandra Escobar
MIEMBRO DE TRIBUNAL

.....

.....

Yo, Laura Cecilia Tierra Macas, 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.

Laura Cecilia Tierra Macas

DEDICATORIA

A Dios por cuidar y guiar mi vida en todo momento.

A mis queridos padres José. T y María. M quienes han sido mi ejemplo y mi pilar fundamental, ustedes me formaron como la persona que soy hoy, han estado siempre conmigo y me brindan su apoyo incondicional; este logro en mi vida es gracias a ustedes.

A mis hermanos por el apoyo, amistad y cariño que me han brindado todos los días.

A esa persona especial que llego a mi vida y hoy forma parte de ella, gracias por todo Diego. C.

Laura C Tierra M

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por brindarme la sabiduría y fortaleza para culminar mi carrera universitaria.

A mis padres y hermanos por su total apoyo durante toda mi vida.

Al Dr. Gerardo Medina y a la Dra. Sandra Escobar por dedicar su tiempo, asesoramiento y colaboración desmedida, por ser los guías del presente Trabajo de Titulación y de esa manera ayudarme a culminar exitosamente esta etapa importante de mi vida.

Laura C Tierra M

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS.....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
ÍNDICE DE GRÁFICAS.....	xiii
RESUMEN.....	xiv
SUMARY	xv
INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO I	
1. MARCO TEÓRICO.....	3
1.1 Bases de Microbiología.....	3
<i>1.1.1 Microbiología.....</i>	<i>3</i>
<i>1.1.2 Microorganismos</i>	<i>3</i>
<i>1.1.3 Tipos de microorganismos.....</i>	<i>4</i>
<i>1.1.1.1 Hongos.....</i>	<i>4</i>
<i>1.1.3.1 Parásitos.....</i>	<i>4</i>
<i>1.1.3.2 Virus</i>	<i>4</i>
<i>1.1.3.3 Bacterias.....</i>	<i>5</i>
1.2 Agua	6
<i>1.2.1 Definición y características</i>	<i>6</i>
<i>1.2.2 Tipos de aguas en la naturaleza.....</i>	<i>7</i>
1.3 Microbiología del agua	8
<i>1.3.1 Microorganismos de agua natural.....</i>	<i>8</i>
<i>1.3.1.1 Microorganismos Autóctonos.....</i>	<i>8</i>
<i>1.3.1.2 Microorganismos Alóctonos.....</i>	<i>9</i>
1.4 Bacterias indicadoras de contaminación	10
<i>1.4.1 Aerobios Mesófilos.....</i>	<i>11</i>
<i>1.4.2 Bacterias Gram Negativas.....</i>	<i>12</i>
<i>1.4.3 Bacterias Gram Positivas.....</i>	<i>14</i>
1.5 Identificación de Carga Microbiana en Agua	15

1.5.1	Crecimiento Bacteriano	15
1.5.1.1	Factores Físico-Químicos para el crecimiento bacteriano.....	16
1.5.2	Placas Petrifilm	17
1.5.2.1	Recuento de Aerobios (AC) en 3M Petrifilm.....	17
1.5.2.2	Recuento de <i>E. coli</i> / Coliformes (EC) en 3M Petrifilm.....	18
1.5.2.3	Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> (Staph Express STX) en 3M Petrifilm.....	18
1.5.2.4	Recuento de Mohos y Levaduras (YM) en 3M Petrifilm.....	18
1.5.3	Tinción Gram	19
1.5.4	Medio de Cultivo	20
1.5.4.1	Tipos de Medios de Cultivo.....	20
1.5.4.2	Medios de Cultivo básicos.....	21
1.5.4.3	Medios de Cultivo Enriquecidos.....	21
1.5.4.4	Medios de Cultivo Selectivos.....	22
1.5.4.5	Medios de Cultivo Diferenciales.....	22
1.5.4.6	Medios de Cultivo Especiales/ Pruebas Bioquímicas.....	22
1.6	Resistencia Bacteriana a los Antibióticos	26
1.6.1	Antibiótico.....	26
1.6.2	Resistencia a Antimicrobianos.....	26
1.6.3	Mecanismo de Resistencia.....	26
1.7	Fuente El Ejido	29

CAPÍTULO II

2.	METODOLOGÍA	30
2.1	Población de Estudio y Localización del Muestreo	30
2.2	Ubicación de la Fuente El Ejido	30
2.3	Metodología de la evaluación microbiológica	30
2.3.1	Muestreo y Pruebas Físico-Químicas <i>In Situ</i>	31
2.3.2	Análisis Microbiológico.....	32
2.3.2.1	Siembra en placas Petrifilm 3M.....	32
2.3.3	Pruebas realizadas a los clones puros y clones seleccionados.....	36
2.3.3.1	Tinción Gram.....	36
2.3.3.2	Prueba de Catalasa para los clones puros seleccionados.....	37
2.3.3.3	Prueba de Oxidasa para los clones puros seleccionados.....	37
2.3.3.4	Prueba de Oxidación- Fermentación (O.F).....	38
2.3.3.5	Prueba de movilidad (MIO).....	38

2.3.4. Pruebas Bioquímicas realizadas a los clones puros seleccionados.....	39
2.3.4.1. <i>Kligler</i>	39
2.3.4.2. <i>Urea (Medio de Christensen)</i>	40
2.3.4.3. <i>Simmons Citrato</i>	41
2.3.4.4. <i>SIM</i>	42
2.3.5. Pruebas de Confirmación realizadas a los clones puros seleccionados	43
2.3.5.1. <i>Agar Manitol</i>	43
2.3.5.2. <i>Agar MacConkey</i>	44
2.3.5.3. <i>Agar Salmonella Shigella</i>	45
2.3.5.4. <i>Agar Eosina Azul de Metileno (E.M.B)</i>	46
2.3.6 Identificación bacteriana.....	47
2.3.7 Resistencia Bacteriana (Antibiograma).....	48

CAPITULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	49
3.1 Resultados de la determinación de la temperatura y el pH.	49
3.2 Análisis Microbiológico.....	50
3.2.1 <i>Análisis de Bacterias Aerobias Mesófilas</i>	50
3.2.2 <i>Análisis de Bacterias Coliformes</i>	52
3.2.3 <i>Análisis de Bacterias E. coli</i>	54
3.2.4 <i>Análisis de Bacterias del género Staphylococcus.</i>	56
3.2.5 <i>Análisis de Mohos y Levaduras</i>	58
3.2.6 <i>Análisis del número de Bacterias aisladas de la Fuente “El Ejido”</i>	59
3.2.7 <i>Análisis de descripción macroscópica de colonias aisladas de la Fuente “El Ejido”</i> <i>61</i>	
3.2.8 <i>Análisis de las pruebas realizadas a los Clones Bacilos Gram Negativos</i>	66
3.2.9 <i>Análisis de las pruebas realizadas a los Clones Diplococos Gram Negativos</i>	69
3.2.10 <i>Análisis de las pruebas realizadas a los Clones Cocos Gram Positivos</i>	69
3.2.11 <i>Análisis de las bacterias identificadas en la fuente “El Ejido”</i>	70
3.3 Antibiogramas.....	74
3.3.1 <i>Análisis de Antibiogramas de Clones Bacilos Gram Negativos</i>	74
3.3.2 <i>Análisis de Antibiogramas de Clones Diplococos Gram Negativos</i>	77
3.3.3 <i>Análisis de Antibiogramas de Clones Cocos Gram Positivos</i>	78
CONCLUSIONES.....	80

RECOMENDACIONES..... 82

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1:	Tipos de Agua en la Naturaleza.....	7
Tabla 2-1:	Mecanismos de Resistencia Bacteriana a los Antibióticos.....	27
Tabla 1-3:	Resultados de la determinación de la temperatura y el pH.....	49
Tabla 2-3:	Recuento de Bacterias Aerobias Mesófilas de la Fuente “El Ejido”	50
Tabla 3-3:	Recuento de Bacterias Coliformes de la fuente “El Ejido”	52
Tabla 4-3:	Recuento de Bacterias <i>E. coli</i> de la Fuente “El Ejido”	54
Tabla 5-3:	Recuento de Bacterias del género <i>Staphylococcus</i> de la Fuente “El Ejido”	56
Tabla 6-3:	Recuento de Mohos y Levaduras de la Fuente “El Ejido”	58
Tabla 7-3:	Número de Bacterias Gram Positivas y Gram Negativas aisladas de la Fuente “El Ejido”	59
Tabla 8-3:	Descripción macroscópica de colonias aisladas de la Fuente “El Ejido”	61
Tabla 9-3:	Pruebas Realizadas a los Clones Bacilos Gram Negativos	66
Tabla 10-3:	Pruebas Realizadas a los Clones Diplococos Gram Negativos	69
Tabla 11-3:	Pruebas Realizadas a los Clones Cocos Gram Positivos	69
Tabla 12-3:	Análisis de las bacterias identificadas en la fuente “El Ejido”	70
Tabla 13-3:	Antibiograma de los Clones Bacilos Gram Negativos de la Fuente “El Ejido” ...	74
Tabla 14-3:	Antibiograma de los Clones Diplococos Gram Negativos de la Fuente “El Ejido”	77
Tabla 15-3:	Antibiograma de los Clones Cocos Gram Positivos de la Fuente “El Ejido”	78

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1:	Interpretación de la prueba Oxidación y Fermentación	23
Figura 2-1:	Interpretación prueba Glucosa y Lactosa, medio Kligler.....	24
Figura 3-1:	Interpretación de la Prueba Citrato	25
Figura 4-1:	Interpretación de la Prueba de Ureasa.....	25
Figura 5-1:	Fuente El Ejido	29
Figura 1-2:	Esquema del proceso de Análisis Microbiológico	31
Figura 2-2:	Sitios donde se realizó la toma de muestra de la fuente “El Ejido”	31
Figura 3-2:	Siembra en Petrifilm 3M.....	33
Figura 4-2:	Siembra por Agotamiento	35
Figura 5-2:	Prueba en el medio Kligler.....	40
Figura 6-2:	Prueba en el medio Citrato.....	41
Figura 7-2:	Prueba en el medio SIM.....	43
Figura 8-2:	Crecimiento en Agar MacConkey.....	45
Figura 9-2:	Crecimiento en Agar Salmonella Shigella	46
Figura 10-2:	Crecimiento en Agar E.M.B.....	47
Figura 11-2:	Características de especies de la familia <i>Enterobacteriaceae</i>	47
Figura 12-2:	Antibiograma	48

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1-3:	Recuento de Bacterias Aerobias Mesófilas de la Fuente “El Ejido”	50
Gráfica 2-3:	Recuento de Bacterias Coliformes de la fuente “El Ejido”	52
Gráfica 3-3:	Recuento de Bacterias E. coli de la Fuente “El Ejido”	54
Gráfica 4-3:	Recuento de Bacterias del Género Staphylococcus de la Fuente “El Ejido”	56
Gráfica 5-3:	Recuento de Mohos y Levaduras de la Fuente “El Ejido”	58
Gráfica 6-3:	Número de bacterias Gram Positivas y Gram Negativas aisladas de la Fuente “El Ejido”	60

RESUMEN

El objetivo fue cuantificar las bacterias aerobias mesófilas, coliformes totales y fecales, y las bacterias patógenas presentes en la Fuente El Ejido, perteneciente al cantón Guano, provincia de Chimborazo. Se realizó un conteo de microorganismos utilizando el método de siembra en placas 3M™ Petrifilm™ sobre el agua, obtenida a partir del sitio de surgencia y el sitio utilizado por la población. El aislamiento fue realizado en Agar Mueller-Hinton, y las colonias aisladas fueron caracterizadas utilizando la tinción Gram, pruebas bioquímicas, fisiológicas, de cultivo, de identificación y pruebas antibiograma a los clones puros aislados, empleando el método de Kirby Bauer. Las colonias aisladas fueron Gram (-) en un 83% (65 clones), siendo la mayor parte bacilos Gram (-) en un 89.3% (58 clones) y solo un 10.7% diplococos Gram (-) (7 clones); el 17% restante fueron identificadas como bacterias Gram (+) (13 clones). De los clones aislados fueron identificados veinte: 7 correspondieron a *Escherichia coli*, 3 a *Pseudomona aeruginosa*, 2 a *Enterobacter aerogenes*, *Moraxella spp*, *Shigella spp* y *Staphylococcus spp* mientras que 1 correspondió a *Proteus vulgaris* y *Serratia spp*. La evaluación de la sensibilidad microbiana mostró que *Enterobacter aerogenes*, y *Serratia spp* son sensibles a todos los antibióticos usados, mientras que 3 clones de *Escherichia coli* y 1 clon de *Moraxella spp* presentaron resistencia a Amoxicilina + Ácido Clavulánico, Kanamicina, Estreptomicina, Imipenem, Ampicilina y Gentamicina, y 2 clones de *Pseudomona aeruginosa* presentaron resistencia a Kanamicina, Amoxicilina + Ácido Clavulánico, Estreptomicina, Ampicilina, y Gentamicina. Los resultados obtenidos indican que la fuente El Ejido posee una microbiota enteropatógena, constituyendo un riesgo para la salud. Se recomienda al Gobierno Autónomo Descentralizado del cantón Guano socializar estos resultados, con el fin de prevenir infecciones por el uso de esta agua.

PALABRAS CLAVE: <BIOQUÍMICA>, <MICROBIOLOGÍA>, <ANÁLISIS DE AGUA>, <PLACAS PETRIFILM>, <MICROORGANISMOS PATÓGENOS>, <ANTIBIOGRAMA>, <FUENTE EL EJIDO>, <GUANO (CANTÓN)>.

SUMMARY

The objective of this study was to quantify mesophilic aerobic bacteria, total and fecal coliforms, and pathogenic bacteria present in the El Ejido water source that belongs to Guano canton, Chimborazo province. A microorganism count was carried out using the seed method on 3M™ Petrifilm™ plates on the water, obtained from the suggested site and the site used by the population. Isolation was performed in Mueller-Hinton Agar, and isolated colonies were characterized using Gram staining and biochemical, physiological, culture, identification and antibiotic testing to the isolated pure clones, using the Kirby Bauer method. The isolated colonies were Gram (-) in 83% (65 clones), with most Gram (-) bacilli in 89.3% (58 clones) and only 10.7% Gram diplococci (-) (7 clones); the remaining 17% were identified as Gram bacteria (+) (13 clones). Of the isolated clones 20 were identified: 7 corresponded to *Escherichia coli*, 3 to *Pseudomonas aeruginosa*, 2 to *Enterobacteria aerogenes*, *Moraxella spp*, *Shigella spp* and *Staphylococcus spp* while 1 corresponded to *Proteus vulgaris* and *Serratia spp*. The evaluation of microbial sensitivity showed that *Enterobacteria aerogenes* and *Serratia spp* are sensitive to all antibiotics used, whereas 3 clones of *Escherichia coli* and 1 clone of *Moraxella spp* showed resistance to Amoxicillin + Clavulanic Acid, Kanamycin, Streptomycin, Imipenem, Ampicillin and Gentamicin, and 2 *Pseudomonas aeruginosa* clones showed resistance to Kanamycin, Amoxicillin + Clavulanic Acid, Streptomycin, Ampicillin, and Gentamicin. The results obtained indicate that the El Ejido water source has an enteropathogenic microbiota, constituting a health risk. It is recommended that the Guano Autonomous Decentralized Government socialize these results, in order to prevent infections due to the use of this water.

KEY WORDS: <BIOCHEMISTRY>, <MICROBIOLOGY>, <WATER ANALYSIS>, <PETRIFILM PLATES>, <PATHOGENIC MICROORGANISMS>, <ANTIBIOGRAM>, <EL EJIDO WATER SOURCE>, GUANO (CANTON)>.

INTRODUCCIÓN

Al ser el agua un recurso fundamental para la vida, el acceso a la misma, tanto en cantidad como en calidad adecuada es un requisito indispensable para una óptima vida de las personas, para conservar su salud, conservación de la biodiversidad, producción de alimentos, etc. En la Constitución del Ecuador se reconoce el derecho de los ciudadanos al agua, derecho que debe ser garantizado mediante la adopción de medidas de preservación y uso racional de las fuentes de agua. (INAMHI, 2011, p. 5).

Para evaluar la relación existente entre la calidad de agua y la salud humana, es preciso tener claro cuál es el concepto de microbiología, para así a partir de ello evaluar la presencia de microorganismos en el agua, sus efectos positivos o negativos y la posibilidad de aplicar una desinfección, entonces el concepto de microbiología según Apella, es una ciencia que estudia seres vivos de tamaño microscópico que existen como células aisladas o asociadas. (APELLA & ARAUJO, 2015, p 34).

De igual manera es preciso conocer que la calidad del agua puede llegar a ser alterada fácilmente debido a varios factores ya sean estos físicos, químicos o biológicos, en el caso de este último la contaminación con microorganismos patógenos ocasionan enfermedades en la población que de una u otra forma hace uso del agua que actúa como vehículo de transmisión de microorganismos. (ANDUEZA, 2014).

Por esta razón resultó trascendental realizar la evaluación microbiológica de la fuente El Ejido perteneciente al Cantón Guano, Provincia de Chimborazo, con el objetivo de determinar la carga bacteriana autóctona y alóctona existente en esta fuente, y en el caso de ser necesario sugerir acciones correctivas para que la carga bacteriana de esta fuente no cause daños en la salud de la población beneficiaria.

El agua de una fuente puede contener o no microorganismos patógenos, y otras sustancias indeseadas, que se originan por algunos factores como los diversos usos que se le ha dado al agua o por la calidad microbiológica propia del agua. De ahí que se debe asegurar que el agua proveniente de una fuente cumpla con la calidad microbiológica, las características físicas, la

composición química, temperatura, etc., los que pueden generar cambios importantes en el agua. (MADIGAN, et al, 1998, p 635).

En este trabajo de investigación se realizó la cuantificación de bacterias aerobias mesófilas, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, coliformes, mohos y levaduras mediante el método de Placas 3M™ Petrifilm™, posteriormente se sembraron bacterias seleccionadas al azar en agares selectivos (Agar Manitol Salado, Agar *Salmonella-Shigella*, etc.) y diferenciales (Agar MacConkey, Agar Eosina azul de Metileno, etc.) con el fin de obtener clones puros. Una vez obtenidos los clones puros se realizaron pruebas fisiológicas y bioquímicas para identificar las principales especies bacterianas que fueron aisladas y que se encuentran presentes en el agua de la fuente El Ejido. (MACFADDIN, 2003, p 733).

Una vez realizada la evaluación microbiológica de la fuente El Ejido también como una contribución más al campo científico, en este trabajo de investigación se determinó la resistencia y sensibilidad a varios antibióticos, de algunos clones puros aislados e identificados, de acuerdo a la metodología de Kirby Bauer de difusión en disco. (NÚÑEZ, 2015, p 39).

Finalmente cabe destacar que este trabajo de investigación contribuye claramente con las pautas planteadas por el Gobierno Ecuatoriano particularmente con lo contemplado en el objetivo 7 del Plan Nacional del Buen Vivir (PNBV), donde se habla de garantizar los derechos de la naturaleza y promover la sostenibilidad ambiental, territorial y global, promoviendo la conservación, buen uso y control de los recursos naturales en los que se incluye el agua, garantizando así los derechos de la naturaleza y promoviendo la sostenibilidad ambiental al realizar la evaluación microbiológica (SENPLADES, 2013).

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1 BASES DE MICROBIOLOGÍA

1.1.1 *Microbiología*

La microbiología es el estudio de los organismos microscópicos, que existen como células aisladas o asociadas (APELLA & ARAUJO, 2015. 34).

Según Prescott, Harley y Klein, (2002) la microbiología es la ciencia que estudia los organismos que son demasiado diminutos para ser vistos a simple vista por el hombre, como los virus, bacterias, parásitos, muchas algas, hongos, y protozoos; empleando medios de cultivo necesarios para cultivarlos y aislarlos. (PRESCOTT, et al, 2002, p 9).

En general la microbiología es una disciplina muy amplia, que sin duda alguna afecta en gran medida a otras áreas relacionadas con la biología y al bienestar humano en general. (PRESCOTT, et al, 2002, p 9).

1.1.2 *Microorganismos*

El término microorganismo se refiere a organismos microscópicos que se encuentran constituidos por una sola célula o varias, en estos organismos también se incluyen a los virus. (MADIGAN, et al, 1998, p 2).

Mientras que, Ocaña. 2015 dice que los microorganismos son seres diminutos causantes de diversas enfermedades y que su aparición se remonta hacia billones de años atrás, durante los cuales sufrieron cambios para poder adaptarse a las condiciones ambientales de la actualidad; su adaptación ha hecho que los microorganismos lleguen a tener hábitats muy variados como: agua, tierra, vegetales, animales, humanos entre otros. (OCAÑA , 2015, p 8).

1.1.3 Tipos de microorganismos

1.1.1.1 Hongos

Según Koneman, *“los hongos son organismos unicelulares o multicelulares que presentan un núcleo y citoplasma definidos. Dentro de este grupo se encuentran las levaduras, estos son hongos unicelulares que se reproducen por fisión binaria. Los mohos u hongos filamentosos son organismos multicelulares más complejos que se reproducen en forma sexuada y asexuada. Algunos hongos tienen fases levaduriforme filamentosa, y se denominan hongos dimórficos”*. (KONEMAN, et al, 2008, p. 3)

1.1.3.1 Parásitos

Los parásitos comprenden un grupo extenso y complejo de microbios, entre ellos se incluyen los organismos unicelulares, como los protozoos que carecen de estructuras necesarias para su reproducción por lo que hacen uso de un huésped para obtener las sustancias que necesitan; y los organismos multicelulares muy complejos con órganos y tejidos bien definidos, como el tracto gastrointestinal y los genitales. (KONEMAN, et al, 2008, p.3).

1.1.3.2 Virus

Los virus son agentes infecciosos que en realidad no son microbios debido a que carecen de la estructura genética completa para su propagación independiente. Los virus que contienen DNA o RNA, pero no ambos, deben hacer uso de un huésped para su reproducción, estos representan la forma más simple de un agente infeccioso. La reproducción de sus ácidos nucleicos se da por

replicación y posteriormente los nuevos genomas se empaquetan en forma individual dentro de los límites de la célula infectada. (PAMBABAY, 2015, p.3).

1.1.3.3 Bacterias

Las bacterias son un tipo de microorganismos que contienen varias especies patógenas para los seres humanos. Biológicamente son organismos unicelulares con DNA y RNA, contienen núcleo, definido en el caso de las bacterias eucariotas y no definido en el caso de las bacterias procariotas; y citoplasma; su reproducción es por fisión binaria. Existen muy pocas familias de bacterias que carecen de algunas estructuras necesarias para la replicación y deben actuar con la célula del huésped para reproducirse. (KONEMAN, et al, 2008, p.3).

Las bacterias al ser microorganismos unicelulares su tamaño es menor que el de una célula eucariota (por ej. *Escherichia coli* $0,5 \times 2 \mu\text{m}$), pero su tamaño puede variar desde $0,2 \mu\text{m}$ de diámetro hasta $40 \mu\text{m}$. (KONEMAN, et al, 2008, p.3).

Las bacterias presentan diferentes formas: esférica, bastón alargado o espiral.

- **Cocos.** - Son esféricos (redondeados, ovoides o elípticos), debido a las agrupaciones que forman; son diplococos cuando quedan unidos dos cocos; si en la división quedan tres o más cocos formando una cadena se los denomina estreptococos, todas estas divisiones se dan en un solo plano, pero, existe un grupo que se denomina estafilococos cuando su agrupación es similar a un racimo de uvas. (PAMBABAY, 2015, p.6).
- **Bacilos.** - Tienen forma de bastón alargado (cilíndricos, fusiformes, etc.)
- **Espirilos.** - Son como un bastón curvado.
- **Vibrios.** - Aquellas cuya imagen proyectada en el plano tienen forma de coma.
- **Filamentosa.** – Estas pueden ser ramificadas o no,
- **Otros.** – Ciertas bacterias tienen forma de anillos y también estructuras con prolongaciones. (APELLA & ARAUJO, 2015, p 33).

Las bacterias también poseen estructuras como:

- **Flagelo:** El flagelo, una estructura procariota de naturaleza proteica (flagelina), no constante, involucrada en la motilidad bacteriana; puede ser polar (localizada en uno o ambos extremos de la bacteria) o peritrica (distribución alrededor de la superficie celular). (APELLA & ARAUJO, 2015, p 35).
- **Endosporas:** Algunos géneros de bacterias, entre ellos *Bacillus*, *Clostridium*, *Sporolactobacillus*, *Sporosarcina*, *Desulfotomaculum*, etc, tienen la capacidad de formar endosporas, que son estructuras de resistencia ante agentes físicos y químicos. (APELLA & ARAUJO, 2015, p 35).
- **Esporulación:** El fenómeno de esporulación (formación de una o varias esporas y liberación posterior) bacteriana está codificado a nivel genético, y en presencia de glucosa los genes responsables se encuentran reprimidos. (APELLA & ARAUJO, 2015, p 35).

1.2 AGUA

1.2.1 Definición y características

El agua es una sustancia fundamental para la supervivencia de todas las formas de vida conocidas, es una molécula formada por tres átomos, uno de oxígeno y dos de hidrógeno (H₂O), unido mediante enlaces polares que permiten la formación de puentes de hidrógeno entre moléculas contiguas. Por esta razón posee elevados puntos de fusión y ebullición. (CARBAJAL & GONZÁLEZ, 2012, p 63-65).

El agua tiene alto calor específico, sirve como amortiguador y regulador de cambios térmicos. Por su alto calor de vaporización permite eliminar mediante el sudor grandes cantidades de calor, las reacciones químicas que ocurren en nuestro cuerpo se realizan en medio acuoso. El agua es usada dentro y fuera de nuestro cuerpo, para el aseo personal, y aseo de todo lo que nos rodea. (CARBAJAL & GONZÁLEZ , 2012, p. 74-77).

1.2.2 Tipos de aguas en la naturaleza

Existen diversos tipos de agua en la naturaleza, pero, entre los más importantes están los mencionados en el Tabla 1-1.

Tabla 1-1: Tipos de Agua en la Naturaleza.

Tipo de Agua	Descripción
Agua natural	Proviene de fuentes naturales, tales como ríos, lagos, manantiales y otros.
Agua Mineral	Contiene más sustancias minerales que el agua potable.
Agua subterránea	Están debajo de la superficie terrestre en una zona de saturación, donde los poros del suelo o las rocas están llenos de agua.
Agua mineral natural	Proviene de fuentes naturales, se caracteriza por el contenido en sales minerales, presencia de oligoelementos, recogidas en condiciones que prueben su pureza bacteriológica original.
Agua mineralizada	Agua purificada adicionada con sales minerales de uso permitido.
Agua mesosapróbica (a, p)	Agua contaminada caracterizada por una población de especies específicas de microorganismos y una moderada concentración de oxígeno. A veces, dos formas se distinguen (A y P), el primero representa el estado más contaminado.
Agua salina	Contiene altas concentraciones de sal, cloruro de sodio, sobre todo más que el agua dulce, pero menos común que el agua del mar.

Agua pesada	Contiene una proporción mayor de lo normal de isótopos pesados de hidrógeno en combinación con oxígeno.
Agua pluvial ácida	El agua de lluvia con un valor de pH inferior a 5.
Agua de manantial o fuente de agua	Agua que emerge espontáneamente a la superficie de la Tierra, para ser explotada.

Fuente: http://www.normalizacion.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2013/11/nte_inen_1882.pdf

Realizado por: Laura Tierra, 2017

1.3 MICROBIOLOGÍA DEL AGUA

1.3.1 *Microorganismos de agua natural*

El agua en general aloja gran cantidad de microorganismos que llegan a adaptarse y colonizar diversos hábitats, dentro de estos microorganismos están células eucariotas como: algas, protozoarios y hongos, también se puede encontrar células procariotas como: bacterias e incluso hasta ciertos tipos de virus; que según sus características físicas, químicas y microbiológicas generan un “perfil” para desarrollarse de forma óptima, este perfil comprende temperatura, concentración de nutrientes y presencia de elementos químicos. (APELLA & ARAUJO, 2015, p 35).

1.3.1.1 *Microorganismos Autóctonos*

Los microorganismos autóctonos corresponden a los microorganismos propios de un lugar. La carga microbiana total en los puntos de emergencia de las fuentes puede ser alta, pero muchos de estos microorganismos se encuentran en estado inactivo, Se conoce que el agua cualquiera que fuese su fuente posee una carga microbiana autóctona depende de las propiedades fisicoquímicas (temperatura, pH, sales minerales, nutrientes) de la misma. (NÚÑEZ, 2015, p 15).

La temperatura del agua tiene un claro efecto selectivo, así, los microorganismos psicotróficos (*C. botulinum* y *Listeria*) abundan en el Ártico y en climas fríos, mientras que los

microorganismos mesofílicos (*V cholerae*, *V parahaemolyticus*) se presentan en hábitats costeros de las zonas templadas. (DE LA ROSA & MOSSO, 2000, p.153).

En manantiales clorurado sódicos e hipertónicos es frecuente la presencia de bacterias halófilas moderadas (*Halomonas*, *Micrococcus*, *Vibrio*) y halotolerantes (*Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Planococcus*) que resisten una elevada osmolaridad debido a complejos mecanismos de regulación interna (DE LA ROSA & MOSSO, 2000, p.155).

1.3.1.2 *Microorganismos Alóctonos*

Los microorganismos alóctonos son aquellos microorganismos que no son propios de un lugar, es decir, que provienen del exterior por factores como animales, plantas y hasta por el mismo hombre. En algunos manantiales se han detectado coliformes, enterococos, *Clostridium* sulfito reductores y *Pseudomonas aeruginosa*. Los coliformes no fecales no presentan un riesgo sanitario ya que pueden proceder del suelo o vegetales y sobreviven en ambientes acuáticos por su facilidad de adaptación formando “biofilms”. (DE LA ROSA & MOSSO, 2000, p.156).

Los enterococos y *Clostridium* sulfito reductores son indicadores de contaminación fecal cuando aparecen ocasionalmente como único indicador, la presencia de *P. aeruginosa* en una fuente no es deseable ya que es un patógeno oportunista y puede producir infecciones en personas inmunodeprimidas, su presencia puede indicar una escasa protección del agua, aunque puede colonizar ambientes acuáticos y encontrarse en aguas no contaminadas por el hombre. (DE LA ROSA & MOSSO, 2000, p.156).

En cuanto a los microorganismos eucariotas se han encontrado en escasa proporción, algas y hongos, principalmente mohos de los géneros: *Penicillium*, *Aspergillus* y *Alternaria*. Estos géneros se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y no afectan a la calidad sanitaria de las aguas en bajas cantidades. (DE LA ROSA & MOSSO, 2000, p.157.).

También se puede encontrar carga microbiana alóctona, que pueden coexistir con los microorganismos autóctonos, pero en ocasiones convierte al agua en una fuente de contaminación y posible causante de enfermedades. (NÚÑEZ, 2015, p 28).

La evaluación de los microorganismos existentes en el agua ayuda a determinar la situación ambiental del lugar, el equilibrio ambiental, y la calidad del ambiente, para sugerir acciones correctivas que ayuden a recuperar ambientes contaminados, evaluando bacterias heterotróficas y hongos mediante especies indicadoras como: *Escherichia coli*, o microorganismos que conllevan a un riesgo sanitario como: *Salmonella*, *Clostridium perfringens*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Legionella*. (NÚÑEZ, 2015, p 29).

1.4 BACTERIAS INDICADORAS DE CONTAMINACIÓN

Desde el punto de vista sanitario, las condiciones bacteriológicas del agua son fundamentales para que se haga uso de esta sin causar daño a la salud o producir enfermedades en la población, ya que el agua debe estar libre de organismos patógenos de cualquier tipo de origen, debido a que estos microorganismos son los responsables directos de producir enfermedades en el ser humano, como salmonelosis, shigelosis, amebiasis, etc.

Para que un microorganismo sea considerado como un indicador de contaminación debe cumplir los siguientes requisitos:

- Fáciles de aislar y crecer en un laboratorio.
- Relativamente inocuos para el hombre y animales.
- Presente en agua relacionada, cuali y cuantitativamente con la de microorganismos patógenos. (APELLA & ARAUJO, 2015, p 37).

Al cumplir los requisitos antes mencionados, existen tres tipos de bacterias que califican como indicadoras de contaminación

- **Coliformes fecales:** indicadores de contaminación fecal.
- **Aerobias mesófilas:** determinan la efectividad del tratamiento de aguas.

- **Pseudomonas:** indican deterioro en la calidad del agua o una recontaminación de la misma. (APELLA & ARAUJO, 2015, p 38).

Si se analiza las bacterias indicadoras de contaminación a partir del punto de vista bacteriológico, para definir la potabilidad del agua, es preciso investigar bacterias aerobias mesófilas y, coliformes totales y fecales. (ANDUEZA, 2014). Las bacterias aerobias mesófilas por su sensibilidad a los agentes de cloración son indicadoras de la eficacia del tratamiento de potabilización del agua. (MADIGAN, et al, 1998, p 634-635).

Las bacterias coliformes se caracterizan por su capacidad de fermentar lactosa a 35°C. Los géneros que componen este grupo son *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter* y *Edwardsiella*. Esta división distingue entre coliformes totales, que son coliformes de origen generalmente ambiental, y coliformes fecales, que corresponde a coliformes de origen solo intestinal con capacidad de fermentar lactosa también a 44,5°C. (KONEMAN, et al, 2008, p.839).

Si existe una contaminación microbiológica fecal se hace referencia a la existencia de coliformes fecales, es decir, que la contaminación se debe a la presencia de material fecal de origen humano y/o animal en el agua; mientras que si existen coliformes totales que desarrollan a 35°C, indica también una contaminación, pero, sin asegurar su origen. (TORTORA, et al, 2007, p. 4).

En el caso de los enterococos que se desarrollan a 35°C se su uso es como indicador complementario de contaminación fecal. (APELLA & ARAUJO, 2015, p 41).

1.4.1 Aerobios Mesófilos

Se conoce como aerobios al grupo formado por bacterias, mohos y levaduras que pueden crecer, cultivarse y desarrollarse entre 30-37°C, en presencia de oxígeno, con una apreciación total de la microflora. El recuento de este tipo de microorganismos permite conocer la calidad microbiológica del agua. (NÚÑEZ, 2015, p 18).

1.4.2 Bacterias Gram Negativas

De acuerdo a la respuesta en una tinción de Gram, se mencionan y describen algunas de las más importantes bacterias Gram negativas, entre los géneros aislados de agua están: *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Gallionella*, *Enterobacteriaceae*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Bordetella*, *Neisseria*, *Moraxella* y *Acinetobacter*. (APELLA & ARAUJO, 2015, p 44).

- ***Pseudomonas***. - Son los microorganismos más comunes en napas (capas de agua subterránea ubicadas a diferentes alturas en el perfil del subsuelo) freáticas por su variabilidad de carbono, y por sus pocos requerimientos nutricionales. Son bacilos psicrófilos, presentan flagelos peritricos, producen pigmentos (verde, azul verdoso, rojo, marrón), no forman esporas, no fermentan azúcares. (TORTORA, et al, 2007, p.4).

Dentro de este grupo la *Pseudomonas aeruginosa* es el microorganismo de mayor relevancia sanitaria, ya que es el patógeno oportunista principal en infecciones de las vías urinarias, intestino, oído y heridas, presenta relativa resistencia al cloro y su presencia en sistemas de almacenamiento es por un mal estado de estos sistemas. (APELLA & ARAUJO, 2015, p 42).

- ***Flavobacterium***. - Este género se encuentra ampliamente en aguas y suelos. Son bacilos sin movilidad, su característica principal es la producción de pigmentos de color amarillo. (TORTORA, et al, 2007, p.5).
- ***Gallionella***. - Son un género de bacilos caracterizados por ser quimiolitótrofos, producen energía por oxidación de Fe_2^+ a Fe_3^+ , precipitación de hidróxidos de (III) en las colonias, hace que tomen una coloración marrón. Crecen en mezclas de aguas aerobias y anaerobias, en la cual exista gran cantidad del ion Fe_2^+ . (APELLA & ARAUJO, 2015, p 44).
- ***Enterobacteriaceae***. – Este género es el más importante en cuanto a los microorganismos anaeróbicos facultativos debido a que su presencia en agua se encuentra asociada a contaminación ya sea fecal o no. Habitan naturalmente el intestino de los animales y son bacilos no esporulados, no móviles y si lo son es por flagelos de inserción peritrica, poseen

requerimientos nutricionales simples, su identificación se realiza porque son capaces de fermentar glucosa y/o lactosa. (MADIGAN, et al, 1998, p 634-635).

Escherichia coli es el microorganismo utilizado como indicador de contaminación fecal de aguas. Si existen cepas patógenas de *E. coli* en el agua pueden causar infecciones agudas en el tracto intestinal. Otros microorganismos patógenos humanos pertenecientes a este grupo son *Shigella*, *Salmonella* y *Klebsiella*. *Shigella dysenteriae* que causa la enfermedad de disentería bacilar, *Salmonella typhimurium* y *typhi* provocan gastroenteritis y fiebre tifoidea respectivamente. (MADIGAN, et al, 1998, p 623).

- ***Vibrio***. - Son un grupo de bacilos curvados, anaerobios facultativos, poseen flagelos polares, aunque algunos son peritricos. Se encuentran en aguas dulces o marinas. *Vibrio cholerae*, es la especie representativa de este género, *Vibrio* es un microorganismo patógeno para humanos que produce el cólera, se transmite exclusivamente por vía hídrica. (TORTORA, et al, 2007, p.5).
- ***Neisseria*, *Moraxella* y *Acinetobacter***. - Corresponden a especies patógenas para el hombre, estas se pueden encontrar en agua. (APELLA & ARAUJO, 2015, p 44). El género *Neisseria*, morfológicamente corresponde a cocos, se han aislado mayormente de acuíferos aeróbicos, algunos pueden causar enfermedades como gonorrea (*Neisseria gonorrhoeae*) y meningitis (*Neisseria meningitidis*). (APELLA & ARAUJO, 2015, p 44).

Los géneros *Moraxella* y *Acinetobacter* son bacilos que pueden transformarse en cocos en la senectud, razón por la cual también se les denomina cocobacilos. Algunas especies de *Moraxella* han sido aisladas de aguas profundas originadas de acuíferos aeróbicos y representantes del género *Acinetobacter* se encuentran frecuentemente en aguas subterráneas aeróbicas. (APELLA & ARAUJO, 2015, p 45).

1.4.3 Bacterias Gram Positivas

El grupo que conforman las bacterias Gram positivas no son muy frecuentes en agua, sin embargo, existen algunos patógenos que han sido aislados de aguas subterráneas y han llegado a infectar a humanos. (APELLA & ARAUJO, 2015, p 45).

Entre las bacterias Gram positivas están los cocos, siendo los más comunes los géneros *Micrococcus*, *Staphylococcus* y *Streptococcus*.

- **Micrococos y estafilococos.** - Son microorganismos aerobios, varias especies de estos tienen importancia como patógenos humanos, toleran altas concentraciones de sal, razón por la cual se diferencian de los estreptococos. (TORTORA, et al, 2007, p.6).
- **Streptococcus.** – Dentro de este género se encuentra *Enterococcus faecalis*, corresponde a un patógeno humano que habita regularmente en el intestino de hombres y animales por lo que su presencia en agua es un indicador de contaminación fecal.
(TORTORA, et al, 2007, p.6).
- **Bacillus** Son bacterias esporulantes, presentan metabolismo aeróbico, se puede aislar de suelos y acuíferos aeróbicos. Algunas especies de *Bacillus* resultan patógenos en animales, generalmente por la producción de poderosas exotoxinas como: la del *Bacillus anthracis*, que produce el ántrax, enfermedad de animales que puede transmitirse a humanos por lo cual se denominan zoonosis. (APELLA & ARAUJO, 2015, p 45).
- **Clostridium.** - Son bacterias esporulantes, presentan metabolismo anaeróbico se puede aislar a partir de suelos, sedimentos, aguas subterráneas anaerobias y de la última porción del tracto intestinal de animales, un ejemplo es el *Clostridium tetani* que en humanos ocasiona el tétano (APELLA & ARAUJO, 2015, p 45).

1.5 IDENTIFICACIÓN DE CARGA MICROBIANA EN AGUA

En una identificación de carga microbiana la validez del examen bacteriológico se justifica en una apropiada toma de muestra, es decir, se debe tomar adecuadamente mediciones de temperatura y pH; en las condiciones adecuadas de transporte (material no degradable ni que cause alteraciones en la muestra) desde el lugar de la fuente de agua hacia el laboratorio de análisis. (APELLA & ARAUJO, 2015, p 46).

El primer paso sugerido es la observación de las características microscópicas en fresco, con una tinción de la muestra recién tomada para así tener un soporte provisional. Luego de esto se realiza una observación macroscópica de las colonias, observando: el tamaño, la forma, los bordes, la consistencia y el color. Esto se realiza en bacterias que hayan crecido en algún medio de cultivo. (PAMBABAY, 2015, p.8).

La importancia de conocer las especies presentes en los sistemas acuosos naturales y el comportamiento en su ambiente, radica en la posibilidad de desarrollar nuevas tecnologías que logren su eliminación y de esta manera controlar enfermedades de origen hídrico. (APELLA & ARAUJO, 2015, p 46).

1.5.1 *Crecimiento Bacteriano*

El crecimiento de los microorganismos se produce gracias a su adaptación y rápida evolución en los distintos medios de cultivo, esto se produce por su versatilidad para obtener materia y energía que ayudan en su metabolismo (BAILÓN, et al, 2003, p. 25), de acuerdo a esto las bacterias se clasifican en:

- **Autótrofos.** – Son bacterias cuya principal fuente de carbono es el dióxido de carbono (CO₂). Dentro de este grupo también están los quimioautótrofos: son bacterias que utilizan el dióxido de carbono (CO₂) como fuente de carbono y compuestos inorgánicos como fuentes de energía (*Nitrobacter* y *Thiobacillus*), y fotoautótrofos: son bacterias que utilizan el dióxido de carbono (CO₂) como fuente de carbono y la luz como fuente de energía. (BAILÓN, et al, 2003, p.12).

- **Heterótrofos.** - Son bacterias cuya principal fuente de carbono es materia orgánica. Dentro de este grupo también están los quimioheterótrofos: son bacterias que utilizan un solo compuesto químico, tanto como fuente de carbono y energía; en este grupo se encuentran la mayoría de bacterias patógenas, y fotoheterótrofos: son bacterias que utilizan las biomoléculas como fuente de carbono y la luz como fuente de energía. (PAMBABAY, 2015, p.8).
- **Fotótrofos.** - Son bacterias cuya principal fuente de energía es la luz. (BAILÓN, et al, 2003, p.12).

1.5.1.1 Factores Físico-Químicos para el crecimiento bacteriano

Entre los factores físico-químicos que pueden afectar el crecimiento de bacterias, están:

- **Temperatura.** – Este es uno de los factores más importantes, debido a que existen temperaturas muy bajas o muy elevadas ya sea para conservar o para inducir la muerte de microorganismos. Con temperaturas muy bajas pierden su fluidez la membrana plasmática y el citoplasma, provocando la disminución del transporte de nutrientes; mientras que a temperaturas elevadas se desnaturalizan las proteínas, los sistemas enzimáticos se inactivan, se deterioran las envolturas celulares, lo que conlleva a una lisis. (OCAÑA, 2015, p 32). Cada bacteria o microorganismo posee una temperatura óptima en la cual esta puede desarrollarse.
- **pH.** - este factor es importante tomarlo en cuenta al momento de cultivar microorganismos, ya que los ambientes naturales tienen un pH entre 5 y 9, siendo estos los valores en los que crecen la mayoría de bacterias, pero algunas pueden crecer a valores inferiores o superiores. (OCAÑA, 2015, pp 32). De acuerdo al rango de pH en el que es posible el desarrollo microbiano, se los clasifica en tres grupos: acidófilos: 1-5; neutrófilos: 5-8 y basófilos: 8-11.5 (APELLA & ARAUJO, 2015, p 46).
- **Otros factores son.** - Biodisponibilidad de agua, presión osmótica, disponibilidad de O₂, tensión superficial y radiaciones. (APELLA & ARAUJO, 2015, p 47)

1.5.2 Placas Petrifilm

Las placas Petrifilm son sistemas que contienen medio de cultivo deshidratados que están listos para la siembra de muestras, estas placas se encuentran sobre películas plásticas que contiene compuestos selectivos, nutrientes, compuestos que gelifican en frío y colorantes para teñir las colonias facilitando su recuento e identificación. (PETRIFILM 3M, 2014, p.2).

Son usadas generalmente en laboratorios microbiológicos e industrias alimenticias, con el fin de realizar pruebas rápidas, reproducibles, de alta eficiencia y de fácil interpretación, reduciendo posibles errores como en los métodos tradicionales de agar. (NÚÑEZ, 2015, p 16).

Las placas Petrifilm facilitan los procesos de ensayos microbiológicos al minimizar el tiempo en las pruebas microbiológicas, ya que para su siembra y lectura se siguen los siguientes pasos:

- **Sembrar:** levantar la película, añadir la muestra (1 mL) y esperar un min, a que solidifique el gel.
- **Incubar:** gracias a su diseño se ahorra espacio en la estufa (máximo 20 petrifilm apiladas).
- **Lectura:** Los pigmentos indicadores que contiene la placa facilita la lectura en pocos minutos. (PETRIFILM 3M, 2014, p.3-4).

Existen diferentes placas de petrifilm para las diferentes aplicaciones microbiológicas, en el presente trabajo de titulación se hará uso de las siguientes placas Petrifilm:

- Recuento de Aerobios (**AC**)
- Recuento de *E. coli* /Coliformes (**EC**)
- Staph Express (para recuento de *Staphylococcus*) (**STX**)
- Recuento de Mohos y Levaduras. (**YM**). (NÚÑEZ, 2015, p 20).

1.5.2.1 Recuento de Aerobios (AC) en 3M Petrifilm

Este petrifilm contiene nutrientes del agar Standars Methods, un agente gelificante soluble en agua fría, y un tinte indicador de color rojo que facilita el recuento de las colonias formadas. (PETRIFILM 3M, 2014).

1.5.2.2 Recuento de E. coli/ Coliformes (EC) en 3M Petrifilm

Las Placas Petrifilm™ para el Recuento de *E. coli*/Coliformes (EC) contienen nutrientes de Bilis Rojo Violeta (VRB), un agente gelificante soluble en agua fría, un indicador de actividad de la glucuronidasa y un indicador que facilita la enumeración de las colonias formadas. Cerca del 97% de las *E. coli* producen beta-glucuronidasa, la que a su vez produce una precipitación azul, (PETRIFILM 3M, 2014).

La película superior de la Placa Petrifilm atrapa el gas producido por *E. coli* y coliformes fermentadores de lactosa. Cerca del 95% de las *E. coli* producen gas, representado por colonias entre azules y rojo-azules asociadas con el gas atrapado. (PETRIFILM 3M, 2014).

1.5.2.3 Recuento de Staphylococcus aureus (Staph Express STX) en 3M Petrifilm

El petrifilm para recuento Petrifilm Staph Express contiene medio de cultivo cromogénico tipo Baird-Parker modificado, es selectivo y diferencial para *Staphylococcus aureus* que se manifiesta en la placa como colonias rojo-violeta. (PETRIFILM 3M, 2014).

Staph Express ha sido diseñado para la detección de las reacciones de desoxiribonucleasa (DNasa) específicas de *Staphylococcus aureus*; Staph Express contiene azul-O toluidina que facilita la visualización de las reacciones de DNasa. (PETRIFILM 3M, 2014).

1.5.2.4 Recuento de Mohos y Levaduras (YM) en 3M Petrifilm

Las placas Petrifilm para Levaduras y Mohos son de fácil recuento, ya que contienen un indicador colorante para levaduras y mohos para proporcionar contraste y facilitar el recuento. (PETRIFILM 3M, 2014).

Para diferenciar las colonias en las placas Petrifilm Levaduras y Mohos se debe buscar una o más de las siguientes características típicas:

- **Levaduras.**

- Colonias pequeñas
- Las colonias tienen bordes definidos
- De color rosa-tostado a azul-verdoso
- Las colonias pueden aparecer alzadas
- Generalmente no tienen un foco (centro negro) en el centro de la colonia. (PETRIFILM 3M, 2014).

- **Mohos.**

- Colonias grandes
- Las colonias tienen bordes difusos
- Color variable (los mohos pueden producir sus propios pigmentos)
- Las colonias son planas
- Generalmente con un foco en el centro de la colonia. (PETRIFILM 3M, 2014).

1.5.3 Tinción Gram

Es una técnica de coloración con valor taxonómico, ya que permite clasificar a las bacterias en Gram (+) contiene una gruesa capa de peptidoglicano, y Gram (-) contiene una fina capa de peptidoglicano con membrana externa de lipopolisacáridos, en función de la respuesta a los reactivos usados. (PAMBABAY, 2015, p.6).

En la tinción Gram las bacterias se clasifican en función al color que toman luego de la tinción Gram; siendo Gram (+) si se tiñen de color violeta oscuro, y Gram (-) si se tiñen de color rosado.

Para realizar la tinción Gram se sigue una secuencia de pasos lógicos en los cuales se agregan cuatro reactivos cada uno con una función específica:

- **Cristal violeta**- colorante violeta
- **Yodo** – fijador de color
- **Alcohol cetona** – decolorante
- **Safranina** – colorante rojo rosa. (PAMBABAY, 2015, p.6).

Al realizar la tinción Gram el mecanismo de acción se da sobre la pared celular de las bacterias; en primer lugar, el cristal violeta realiza la tinción del citoplasma tanto de bacterias Gram (+)

como de bacterias Gram (-), posterior a esto se añade el yodo, el cual forma cristales con el colorante los mismos que no pueden atravesar la pared celular. (TORTORA, et al, 2007, p.69).

Luego se procede a añadir el decolorante, la función de este es deshidratar el peptidoglicano de las bacterias Gram (+) y las vuelve más impermeables a los cristales formados anteriormente con la adición del yodo; en el caso de las bacterias Gram (-) el alcohol del decolorante crea orificios en la capa de peptidoglicano por donde ingresa la safranina y hace que la bacteria se tiña. (TORTORA, et al, 2007, p.69).

1.5.4 Medio de Cultivo

Se denomina medio de cultivo a cualquier sustancia o mezclas de sustancias que tienen la capacidad de crear un hábitat artificial y equilibrado de una solución de nutrientes que, en concentraciones y condiciones físicas adecuadas permiten el desarrollo de los microorganismos, que crecerán y se multiplicarán para dar lugar a colonias. (BAILÓN, et al, 2003, p.16).

Los componentes de un medio de cultivo juegan un papel muy importante en el crecimiento bacteriano, ya que son los encargados de proporcionar a las bacterias fuentes de energía, carbono, nitrógeno, sales y agua. (PAMBABAY, 2015, p 11). Los objetivos de los medios de cultivo son: establecer el ambiente propicio para el crecimiento y desarrollo bacteriano y además de ello facilitar reacciones bioquímicas características de cada especie, que posteriormente serán útiles en la identificación microbiana. (BAILÓN, et al, 2003, p.16).

1.5.4.1 Tipos de Medios de Cultivo

Medios líquidos. - Son aquellos medios que se encuentran exentos de agar, Ejemplo. Caldos, estos medios generalmente son usados para la identificación de bacterias, recuento por turbidimetría y realización de inóculos. (PRESCOTT, et al, 2002, p 109)

Medios sólidos: Estos medios llevan un agente solidificante el cual se denomina agar, un polisacárido que gelifica por debajo de 45° C, los medios sólidos son usados a una concentración >al 1,0%. Como ejemplo están: Agar Nutritivo, PCA, Mueller Hinton, Agar Sangre, etc. Se utiliza

generalmente para el aislamiento, purificación y visualización de colonias, identificación de colonias y antibiogramas (PRESCOTT, et al, 2002, p 109).

Medios semisólidos: Se denomina medio semisólido a un agar que se encuentra a una concentración < del 1.0 %, ejemplo: agar SIM, como usos de estos medios están las pruebas bioquímicas (O-F, Movilidad). (PRESCOTT, et al, 2002, p 110).

1.5.4.2 Medios de Cultivo básicos

Solo contienen extracto de carne u otra infusión simple, peptona, sal (crea isotonicidad que mantiene la presión osmótica constante) y agua; estos componentes proporcionan vitaminas, aminoácidos y en pequeñas cantidades hidrogeno, nitrógeno y carbono, estos medios de cultivo permiten el crecimiento de la mayoría de bacterias; entre ellos están: caldo y agar nutritivo, agar de infusión de cerebro y corazón, etc. (BAILÓN, et al, 2003, p.18).

1.5.4.3 Medios de Cultivo Enriquecidos

Estos medios de cultivo están formados por sustancias básicas, además también contienen líquidos corporales, vitaminas específicas, aminoácidos, proteínas y otros nutrientes que sirven para el crecimiento de la mayoría de bacterias, algunos ejemplos de medios de cultivo enriquecidos son: Agar sangre, Agar chocolate, Agar Mueller-Hinton, entre otros. (APELLA & ARAUJO, 2015, p 47).

Agar Mueller Hinton: Este agar es un medio de cultivo enriquecido, usado como medio de elección para el aislamiento y antibiogramas, debido a que favorece el crecimiento de todo tipo de células bacterianas. Su composición en g/L de agua destilada es: 300g de infusión de carne, 17,5g de hidrolizado de caseína, 1,5g de almidón, 17g de agar y un pH de 7,4. (MADIGAN, et al, 1998, p. 602).

1.5.4.4 Medios de Cultivo Selectivos

Parten del medio de cultivo base o enriquecido, al cual posteriormente se le agrega compuestos cuya función es inhibir el crecimiento de algunas bacterias y que permitir el crecimiento de otras; dichos compuestos pueden ser: antibióticos, antisépticos, sales biliares y cloruro de sodio, utilizados a concentraciones muy altas. Un ejemplo de este medio de cultivo es el Agar manitol salado. - este medio de cultivo es usado en el aislamiento de *Staphylococcus*, porque posee un elevado contenido de NaCl el cual inhibe el crecimiento del resto de bacterias. (PAMBABAY, 2015, p.11).

1.5.4.5 Medios de Cultivo Diferenciales

Son medios básicos o enriquecidos, a los cuales se les ha agregado determinados reactivos que reaccionarán con grupos de bacterias específicas, estos medios sirven para poner de manifiesto la diferencia entre grupos de bacterias. Un ejemplo de este medio es el Agar MacConkey, su función es aislar bacterias Gram (-) de fácil crecimiento, especialmente las bacterias del género *Enterobacteriaceae*. (BAILÓN, et al, 2003, p.20).

1.5.4.6 Medios de Cultivo Especiales/ Pruebas Bioquímicas

Son medios de cultivo que debido a sus compuestos sirven para comprobar una o más características bioquímicas de las bacterias.

Existen pruebas bioquímicas de lectura rápida y de lectura lenta; al referirnos a las primeras, estas se fundamentan en la presencia de una enzima que al entrar en contacto con una sustancia generan un resultado en pocos segundos o minutos, mientras que, al referirnos a las segundas, la lectura de estas requiere de horas e incluso días de incubación. (APELLA & ARAUJO, 2015, p 48)

Pruebas bioquímicas de lectura rápida

- **Catalasa.** - Enzima que forma parte de casi todas las bacterias que tienen citocromos. Dicha enzima al ponerse en contacto con el peróxido de hidrogeno lo hidroliza en agua y oxígeno, este último es rápidamente observable en forma de burbujas. (OCAÑA, 2015, p 20).
- **Oxidasa.** - Se trata de una enzima que cataliza las reacciones oxido reducción, la reacción se produce debido a la presencia de un sistema citocromo oxidasa que activa la oxidación del citocromo, el cual se reduce por acción del oxígeno molecular dando como resultado agua o peróxido de hidrogeno. Esta reacción la efectúan las bacterias aerobias y las anaerobias facultativas. (PAMBABAY, 2015, p.12).

Pruebas bioquímicas de lectura lenta

- **Prueba de oxidación y fermentación.** – A través de esta prueba se determina si las bacterias metabolizan un hidrato de carbono por oxidación o fermentación. En esta prueba se utilizan dos tubos con Medio O/F, el uno está expuesto al aire mientras que el otro es sellado para crear el ambiente anaerobio; las bacterias aerobias estrictas son oxidativas, mientras que las aerobias tolerantes y las anaerobias estrictas son fermentativas. (BAILÓN, et al, 2003, p.63).

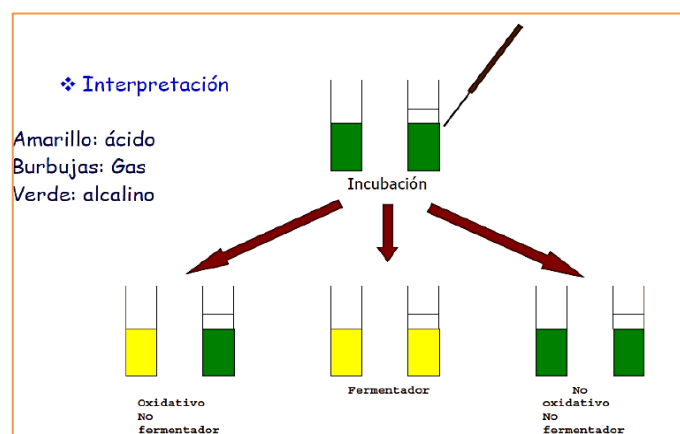


Figura 1-1: Interpretación de la prueba Oxidación y Fermentación

Fuente: Bailón Lucía, 2003

- **Prueba de glucosa y lactosa, Medio Kligler.** - Cada componente de este y los demás medios cumplen funciones específicas; la peptona y tripteina son las sustancias que brindan los nutrientes necesarios para el crecimiento del microorganismo, el cloruro de sodio mantiene el equilibrio osmótico, el agar es el solidificante, el rojo de fenol es el indicador de pH. (BAILÓN, et al, 2003, p.102).
- A través de esta prueba se determina la fermentación de la glucosa y la lactosa, la producción de gas a partir de la glucosa y la producción de ácido sulfhídrico. (BAILÓN, et al, 2003, p.102).

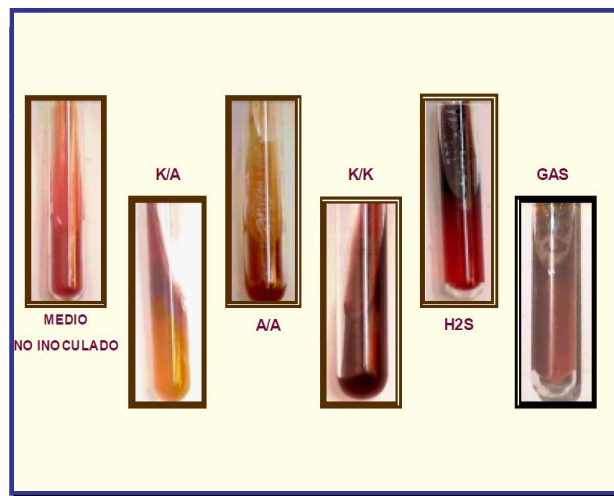


Figura 2-1: Interpretación prueba Glucosa y Lactosa, medio Kligler

Fuente: Bailón Lucía, 2003

Interpretación:

K / A (Fermentación de glucosa solamente)

A / A (Fermentación de glucosa y lactosa)

K / K (No fermentación de glucosa y lactosa). (BAILÓN, et al, 2003, p.102).

- **Prueba Citrato. Medio Citrato de Simmons:** Identifica si las bacterias usan el citrato como única fuente de carbono y crecimiento; y el fosfato de amonio como fuente de nitrógeno. (BAILÓN, et al, 2003, p.42).



Figura 3-1: Interpretación de la Prueba Citrato

Fuente: Bailón Lucia, 2003

- **Prueba de Sulfuro Indol y Movilidad. Medio SIM:** Esta prueba determina la presencia en bacterias de la enzima triptofanasa, la cual se encarga de degradar el aminoácido triptófano a indol, manifestado por la aparición de un anillo rojizo debido a que el reactivo de Kovac reacciona con el indol. A partir del tiosulfato de sodio los microorganismos pueden generar ácido Sulfhídrico y debido al agar se puede detectar la movilidad. (BAILÓN, et al, 2003, pp.92).
- **Prueba de ureasa. Medio urea:** Esta prueba determina si un microorganismo tiene la capacidad de desdoblar urea mediante un proceso de alcalinización producida en el medio de cultivo y detectada mediante el indicador rojo fenol, indicador de pH. (BAILÓN, et al, 2003, pp.69).



Figura 4-1: Interpretación de la Prueba de Ureasa

Fuente: Bailón Lucia, 2003

1.6 RESISTENCIA BACTERIANA A LOS ANTIBIÓTICOS

1.6.1 Antibiótico

Un antibiótico es una sustancia que posee actividad antibacteriana. (MACFADDIN, 2003, p 732).

1.6.2 Resistencia a Antimicrobianos

Se refiere a la capacidad de un organismo para poder resistir el efecto de un antibiótico al que normalmente es sensible. Dicha resistencia se produce por genes de resistencia que han sido transmitidos mediante intercambio genético. (MADIGAN, et al, 1998, p 635).

1.6.3 Mecanismo de Resistencia

La flora microbiana natural del suelo, agua, etc. presenta mecanismos para defenderse de la actividad de los antibióticos, es decir, que estos son mecanismos naturales de resistencia, anteriores al uso en el ámbito clínico de los antibióticos. (KONEMAN, et al, 2008, p. 847).

Las razones por las que los microorganismos pueden tener una resistencia permanente al antibiótico son las siguientes:

- El microorganismo carece de la estructura sobre la que actúa el antibiótico; ejemplo, los micoplasmas, carecen de pared celular típica, como resultado de ello son resistentes a las penicilinas. (MADIGAN, et al, 1998, p 635).

- El microorganismo es impermeable frente al antibiótico; ejemplo, en su gran mayoría las bacterias Gram (-) son impermeables a la penicilina G. (MADIGAN, et al, 1998, p 635).

- Inactivación del antibiótico por parte del organismo; ejemplo, diversos estafilococos pueden producir β -lactamasas que rompen el anillo β -lactámico de la mayoría de penicilinas. (MADIGAN, et al, 1998, p 635)..
- Modificación de la diana del antibiótico por parte del organismo, esto se produce por un cambio genético; por ejemplo, diversas bacterias patógenas desarrollan resistencia a sulfonamidas (inhiben la producción de ácido fólico) porque modificaron genéticamente su metabolismo consiguiendo incorporar el ácido fólico ya sintetizado del medio, evitando así una ruta donde actúan las sulfonamidas. (MADIGAN, et al, 1998, p 635).

Por las razones anteriormente mencionadas la resistencia a antibióticos es considerada uno de los principales problemas al momento de tratar la mayoría de los microorganismos patógenos conocidos. (MADIGAN, et al, 1998, p 635).

A continuación, se presenta un cuadro con los mecanismos de resistencia bacteriana a los antibióticos.

Tabla 2-1: Mecanismos de Resistencia Bacteriana a los Antibióticos.

Mecanismo de resistencia	Ejemplo de antibiótico	Base genética de la resistencia	Mecanismo presente en:
Permeabilidad reducida	Penicilinas	Cromosómica	<i>Pseudomona aeruginosa</i> <i>Bacterias entéricas</i>
Inactivación del antibiótico (por ejemplo, penicilinas;	Penicilinas	Plasmídica y cromosómica	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacterias entéricas</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i>

enzimas modificadoras como metilasas, acetilasas, fosforilasas y otros).	Cloranfenicol	Plasmídica y cromosómica	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacterias entéricas</i>
	Aminoglicósidos	Plasmídica	<i>Staphylococcus aureus</i>
Alteración de la diana (por ejemplo, RNA polimerasa, rifamicina; ribosoma, eritromicina y estreptomicina; DNA girasa, quinolonas).	Eritromicina Rifamicina Estreptomicina Norfloxacino	Cromosómica	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacterias entéricas</i> <i>Bacterias entéricas</i> <i>Bacterias entéricas</i> <i>Staphylococcus aureus</i>
Desarrollo de una ruta bioquímica resistente	Sulfonamidas	Cromosómica	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacterias entéricas</i>
Eflujo (bombeo hacia el exterior de la célula)	Tetraciclinas Cloranfenicol	Plasmídica Cromosómica	<i>Bacterias entéricas</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacillus subtilis</i>

Fuente: Madigan Michael, 1998

La resistencia a antibióticos puede ser genéticamente codificada por el microorganismo, ya sea en el cromosoma, en los plásmidos, en los llamados plásmidos de resistencia (factores R), etc., como se puede observar en la tabla 2-1 los tipos específicos de resistencia tienen su base genética en una u otra localización. (MADIGAN, et al, 1998, p 634).

1.7 FUENTE EL EJIDO



Figura 5-1: Fuente El Ejido

Fuente: Laura Tierra, 2017

Se denomina El Ejido a la explanada que se encuentra ubicada en el Barrio Santa Teresa, a dos kilómetros del cantón Guano, provincia de Chimborazo. El agua de la fuente El Ejido se encuentra a 2608 msnm, brota de la peña de Langos y posee minerales. Esta explanada consta de una fuente de agua natural que es usada por la población del lugar para el aseo personal, lavado de ropa e incluso para el consumo humano. (AME, 2016).

El propósito de realizar la evaluación microbiológica de esta fuente es aislar e identificar la carga microbiana autóctona y alóctona existente en la fuente El Ejido y determinar cuáles de estos microorganismos presentan resistencia a ciertos antibióticos.

CAPÍTULO II

2. METODOLOGÍA

2.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO Y LOCALIZACIÓN DEL MUESTREO

La población de estudio del presente trabajo de titulación realizado en la fuente El Ejido son la microbiota autóctona y alóctona, entre ellos los *Aerobios mesófilos*, *Coliformes* totales y *Coliformes* fecales, *Staphylococcus*, mohos y levaduras presentes en el ojo de agua (A), sitio cercano (50 cm) al ojo de agua (B) y el sitio utilizado por la población para aseo personal y lavado de ropa (C).

2.2 UBICACIÓN DE LA FUENTE EL EJIDO

La fuente El Ejido se localiza en el barrio Santa Teresa, en la vía San Vicente de Elempata-Los Elenes, junto al parque acuático Los Elenes, perteneciente al Cantón Guano, Provincia de Chimborazo.

2.3 METODOLOGÍA DE LA EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA

La metodología para realizar la evaluación microbiológica de la fuente El Ejido se describe en la figura 1-2.

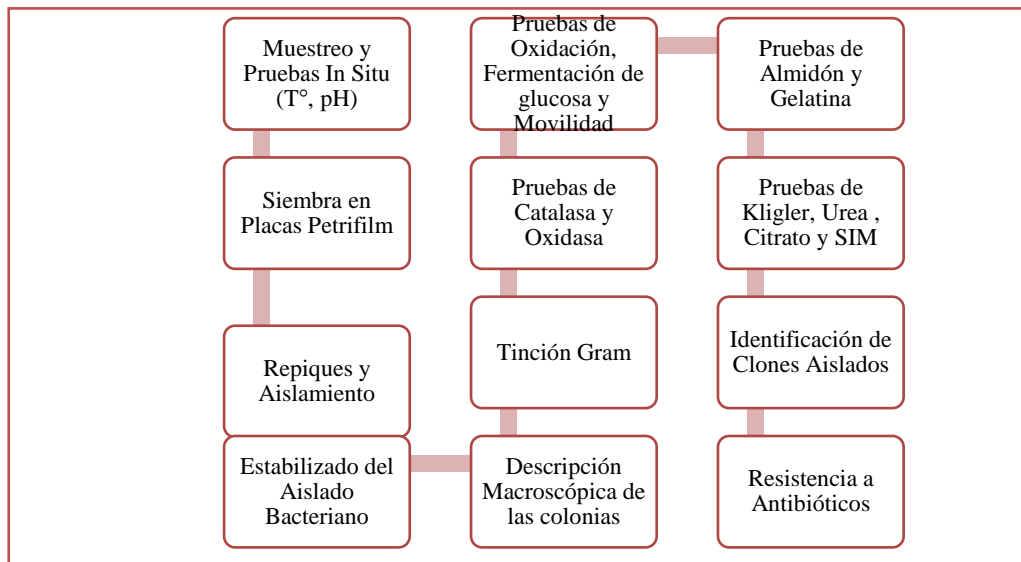


Figura 1-2: Esquema del proceso de Análisis Microbiológico

Realizado por: Laura Tierra, 2017

2.3.1 Muestreo y Pruebas Físico-Químicas In Situ



Figura 2-2: Sitios donde se realizó la toma de muestra de la fuente “El Ejido”

Realizado por: Laura Tierra, 2017

Se tomaron muestras del sitio A, B y C de la fuente El Ejido, para realizar el muestreo se debe usar un adecuado equipo de protección (mandil, guantes) para proceder con la toma de la muestra (cantidad representativa para el análisis microbiológico) en contracorriente, cerrar el frasco (adecuado para muestreo) y sellarlo fuera del agua inmediatamente.

Al mismo tiempo de ello se siguió las indicaciones de las normas: NTE INEN 1105:1983 Agua. Muestreo para examen microbiológico y la norma NTE INEN 2169:2013 Agua. Calidad del agua. Muestreo. Manejo y Conservación de muestras. Según la norma NTE INEN 2169:2013 Debe incluirse al menos los siguientes datos en el informe de muestreo:

- Localización y nombre del sitio de muestreo
- Detalles del punto de muestreo
- Fecha de la recolección
- Método de recolección
- Hora de la recolección
- Nombre del recolector
- Condiciones atmosféricas
- Naturaleza del pretratamiento
- Datos recogidos en el campo. (INEN, 2013).

Las pruebas Físico- Químicas se realizaron In Situ, es decir, en la fuente, tomando en cuenta normas de asepsia para tomar la Temperatura y pH, con ayuda de un termómetro y tirillas para pH. (INEN, 1983)

2.3.2 *Análisis Microbiológico*

2.3.2.1 *Siembra en placas Petrifilm 3M*

La siembra en placas petrifilm se realizó en la cámara de flujo laminar, cada muestra se sembró por duplicado siguiendo las instrucciones de la guía 3M Petrifilm, según el siguiente protocolo:

1. Colocar la placa Petrifilm en una superficie plana y levantar el film superior.
2. Pipetear 1 mL de muestra en el centro del film inferior. Conservar la pipeta verticalmente. No tocar el film inferior durante el pipeteo.
3. Bajar el film superior y dejarlo caer. No deslizar el film hacia abajo.
4. Colocar el aplicador en el film superior bien centrado sobre el inóculo.

5. Aplicar presión suave sobre el aplicador para distribuir el inóculo por toda la zona circular.
6. Levantar el aplicador. Esperar 1 minuto para que se solidifique el gel. Incubar las placas Petrifilm cara arriba y apiladas en grupos de no más de 20 placas, a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas, excepto para mohos y levaduras, en la que varía a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por un periodo de 3-5 días.
7. Transcurrido el respectivo tiempo de incubación se debe realizar el conteo de cada placa petrifilm y expresar los resultados como unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL). (PETRIFILM 3M, 2014).

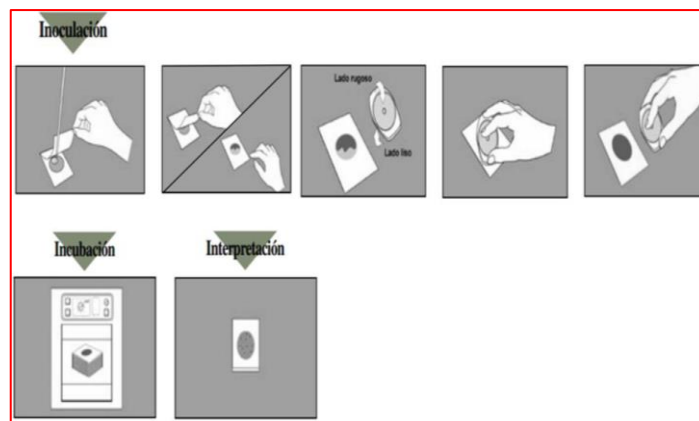


Figura 3-2: Siembra en Petrifilm 3M

Fuente: 3M Petrifilm, 2014

2.3.2.2 Preparación y Repiques en Agar Mueller Hinton

El Agar Mueller Hinton es un medio de cultivo no selectivo utilizado para promover el desarrollo microbiano.

Preparación

- Suspender los gramos (38g en 1L de agua destilada) calculados de agar Mueller Hinton de acuerdo al número de placas a preparar, en la cantidad de agua destilada que se requiera.
- Calentar con agitación frecuente y hervir hasta que se disuelva totalmente.
- Autoclavar a 15 p.s.i, 121°C por un período de 15 minutos.
- Enfriar y distribuir en las cajas petri estériles, en volumen aproximado de 15 ó 20 mL sobre una superficie horizontal.

- Dejar solidificar el medio de cultivo, las placas de cultivo preparadas se deben almacenar en bolsas de plástico a una temperatura de 2-8 °C.

Repiques

- Hacer una selección de las colonias más representativas y características de las distintas placas petrifilm.
- **Primer repique:** En el interior de la cámara de flujo laminar levantar el film superior de la placa de petrifilm y con un palillo estéril tomar cuidadosamente la colonia seleccionada y dar un toque en el agar Mueller Hinton (repicar); repetir este paso con todas las colonias que fueron previamente seleccionadas.
- Incubar a 37°C durante 24 horas.
- A las 24 horas describir las siguientes características de las colonias: color, tamaño, bordes, forma, entre otras.
- **Segundo repique:** De las colonias que crecieron en el primer repique realizar otro repique con ayuda de un palillo estéril tocar la colonia y repicar sobre la placa de Mueller Hinton haciendo uso de una cuadrícula para guiarse en la siembra de las colonias.
- Incubar a 37°C durante 24 horas.
- Transcurridas las 24 horas observar las características macroscópicas de las colonias.
- **Tercer repique:** A partir de las colonias del segundo repique realizar el tercer repique siguiendo los pasos descritos anteriormente.
- **Cuarto repique:** A partir de las colonias del tercer repique realizar un cuarto repique siguiendo los pasos descritos anteriormente.

2.3.2.3 Siembra por Agotamiento

Con cada colonia crecida a partir del cuarto repique realizado, se realizó una siembra por agotamiento.

La siembra por agotamiento se realizó tomando una colonia bacteriana con la cual se tocó con suavidad la superficie del medio de cultivo (Mueller Hinton) preparado, y se extendió la muestra como se observa en la Figura 4-2, tratando de que el estriamiento realizado sea lo más largo

posible con el propósito de conseguir al final del estriamiento un crecimiento de clones puros. (GoumH, 2014).

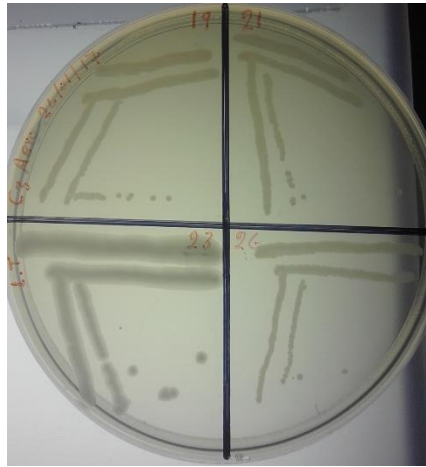


Figura 4-2: Siembra por Agotamiento

Fuente: Laura Tierra, 2017

2.3.2.4 *Obtención de clones puros*

Los clones puros se obtuvieron tomando una colonia que creció en la siembra por agotamiento y se procedió a sembrar en una nueva placa con medio de cultivo Mueller Hinton, posteriormente se incubó a 37°C durante 24 horas para el crecimiento de colonias bacterianas puras. El proceso anteriormente mencionado se repitió con cada colonia bacteriana, para la obtención de colonias o clones puros.

2.3.2.5 *Descripción macroscópica de los clones puros*

Transcurrido el tiempo de incubación observar a contra luz las siguientes características de los clones puros.

- Forma de las colonias: circular, puntiforme, irregular, etc.
- Bordes: entero, ondulado, filamentosos
- Superficie: lisa, rugosa, plegada

- Consistencia: cremosa, membranosa
- Color
- Luz transmitida: opaca, translúcida, transparente
- Tamaño: en milímetros (mm)

2.3.3 Pruebas realizadas a los clones puros y clones seleccionados

2.3.3.1 Tinción Gram

La tinción Gram se realizó a cada una de los clones puros, para esto se procedió de la siguiente manera:

- Se colocó una gota de solución salina (suero fisiológico) en una placa porta objetos previamente esterilizada.
- Con el asa estéril se tomó una pequeña muestra de los clones puros y se diluyó en la gota de solución salina.
- Se fijó la placa exponiéndola suavemente a un mechero por 3 veces.
- Luego a la placa fijada se cubrió con cristal violeta y transcurrido 1 minuto se enjuagó con agua destilada.
- Se agregó lugol y transcurrido 1 minuto se enjuagó con agua destilada.
- Se agregó alcohol-cetona y transcurridos 30 segundos se enjuagó con agua destilada.
- Se colocó safranina y transcurrido 1 minuto y se enjuagó con agua destilada, y se dejó secar las placas totalmente.
- Finalmente se colocó una gota de aceite de inmersión y se observó las placas en el microscopio con el lente 100x. (CAVALLINI, et al. 2009, p 63).

Una vez observadas todas las placas de los clones puros se procedió a seleccionar 20 de ellas (clones puros) para las pruebas posteriores, tomando en cuenta aspectos como: sitio de muestreo, procedencia de placa petrifilm, descripción macroscópica y tinción Gram.

2.3.3.2 Prueba de Catalasa para los clones puros seleccionados

La catalasa es una enzima que al ponerse en contacto con el peróxido de hidrogeno se puede observar el desprendimiento de burbujas (O₂).

- Se colocó una gota de peróxido de hidrógeno de 10 volúmenes en una placa porta objetos limpia.
- Con ayuda de un palillo estéril se tomó una pequeña cantidad de muestra de un clon puro y se emulsionó en la placa porta objetos.
- Finalmente se observó si existe la producción rápida y sostenida de burbujas o efervescencia, lo que indica que es una prueba de catalasa positiva.
- Se repitió el proceso anteriormente indicado con todos los clones puros seleccionados. (BARROW & FELTHAM. 1993, p. 23-26).

2.3.3.3 Prueba de Oxidasa para los clones puros seleccionados

La oxidasa es una enzima que cataliza las reacciones oxido reducción, donde el oxígeno se reduce a agua o peróxido de hidrogeno. Esta reacción la efectúan las bacterias aerobias y las anaerobias facultativas (PAMBABAY, 2015, p.12).

- Se tomó con un palillo estéril una pequeña cantidad de muestra de un clon puro.
- Se colocó en una tirilla para prueba de oxidasa la muestra tomada.
- Luego de transcurrir unos 30 segundos se leyó el resultado para lo cual se considera positiva si la tirilla toma una coloración azul marino, y negativa si la tirilla no presenta cambio de coloración.
- Se repitió el proceso anteriormente indicado con todos los clones puros seleccionados. (BARROW. & FELTHAM 1993, p. 30).

2.3.3.4 Prueba de Oxidación- Fermentación (O.F)

Esta prueba determina si las bacterias metabolizan un hidrato de carbono por oxidación o fermentación. (GARCÍA, et al, 1997, p.29).

- Preparar medio Hugh Leifson (O.F) (medio usado para determinar el metabolismo oxidativo fermentativo de las bacterias Gram negativas).
- Para 1L de medio: disolver 9.4 g del medio O.F en 1000 mL de agua destilada.
- Esterilizar en la autoclave a 121°C por un periodo de 15 minutos.
- Haciendo uso de la cámara de flujo laminar distribuir asépticamente 5mL en tubos estériles y se dejó solidificar verticalmente.
- Se preparó la cantidad suficiente para realizar la prueba por duplicado.
- Posteriormente con ayuda de la aguja de inoculación se sembró cada clon puro en dos tubos del medio O.F, y a uno de los tubos, se recubrió con vaselina estéril
- Se dejó incubar a 35°C por 72 horas, para posterior a ello realizar las lecturas correspondientes.
- El resultado es positivo por el viraje de violeta a amarillo del indicador. Las bacterias aerobias estrictas son oxidativas, mientras que las aerobias tolerantes y las anaerobias estrictas son fermentativas. (GARCÍA, et al, 1997, p.29).

2.3.3.5 Prueba de movilidad (MIO)

- Preparar agar movilidad (medio usado para determinar la movilidad de un bacilo Gram negativo)
- Preparado el medio se procedió a sembrar con ayuda de una aguja de inoculación cada uno de los clones puros en el agar preparado.
- Posteriormente se incubó durante 48 horas a una temperatura de 35°C.
- Transcurrido este tiempo se procedió a realizar las lecturas correspondientes, la prueba se reportó como positiva si existía enturbiamiento o crecimiento más allá de la línea de siembra

Si los clones puros Gram negativos dieron resultados positivos en el medio O/F, en agar movilidad, y oxidasa negativos, se las considera como bacterias *E. coli*. (BARROW & FELTHAM, 1993, p. 198-200).

2.3.4. Pruebas Bioquímicas realizadas a los clones puros seleccionados

2.3.4.1. Kligler

Esta prueba determina la fermentación de glucosa, lactosa, producción de gas a partir de la glucosa y la producción de ácido sulfhídrico. (BAILÓN, et al, 2003, p.102).

- Se preparó el medio Kligler (52g en 1L de agua destilada), la cantidad de tubos necesarios.
- Se calentó con ayuda de un reverbero, con agitación frecuente y hervir hasta que se disuelva totalmente.
- Se esterilizó en la autoclave a 121°C por 15 minutos.
- Cuando el medio está a una temperatura de 40 a 50 °C se colocó en tubos estériles, a razón de 5mL, en forma de pico de flauta y se tapó los tubos con corchos estériles.
- Con ayuda de la aguja de inoculación, esterilizada tocar un clon y sembrar en zic-zac en el tubo.
- Luego se incubó a 35°C por 24 horas.
- Transcurrido el tiempo de incubación se realizó las lecturas correspondientes.

La fermentación de la glucosa provoca el viraje del fondo del tubo a amarillo (K/A alcalino-acido)

La fermentación de la lactosa provoca el viraje de todo el tubo a amarillo (A/A).

La producción de sulfhídrico provoca un ennegrecimiento de todo el tubo o parte de él (A/AS).

La formación de gas se observa por la formación de burbujas o resquebrajamiento del medio. (GARCÍA, et al, 1997, p.30).

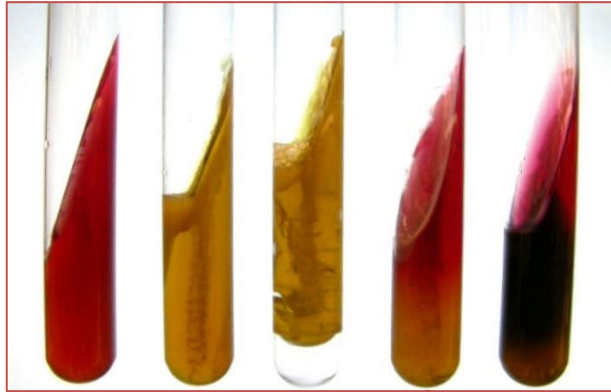


Figura 5-2: Prueba en el medio Kligler

Fuente: Forbes Betty, 2009

2.3.4.2. Urea (*Medio de Christensen*)

Esta prueba determina si un microorganismo tiene la capacidad de desdoblar urea mediante un proceso de alcalinización producida en el medio de cultivo.

- Se preparó el medio Urea (24g en 1L de agua destilada), la cantidad de tubos necesarios.
- Se calentó con ayuda de un reverbero, con agitación frecuente y hervir hasta que se disuelva totalmente.
- Se esterilizó en la autoclave a 121°C por 15 minutos.
- Cuando el medio está a una temperatura de 40 a 50 °C se añadió una solución estéril de urea (100mL para 1L de medio).
- Se colocó en tubos estériles, en forma de pico de flauta, y se tapó con corchos estériles
- Con ayuda de la aguja de inoculación, esterilizada tocar un clon y sembrar en zic-zac en el tubo.
- Luego se incubó a 35°C por 24 horas.
- Transcurrido el tiempo de incubación se realizó las lecturas correspondientes.

Se considera una prueba positiva si la coloración del medio se torna rosada ya sea en el pico de flauta o en todo el medio, es negativo cuando el medio conserva su color original (amarillo). (FORBES, et al, 2009, p.96).

2.3.4.3. Simmons Citrato

Identifica si las bacterias usan el citrato como única fuente de carbono y crecimiento; y el fosfato de amonio como fuente de nitrógeno. (BAILÓN, et al, 2003, p.42).

- Se preparó el medio Simmons Citrato (24,2g en 1L de agua destilada), la cantidad de tubos necesarios.
- Se calentó con ayuda de un reverbero, con agitación frecuente y hervir hasta que se disuelva totalmente.
- Se esterilizó en la autoclave a 121°C por 15 minutos.
- Cuando el medio está a una temperatura de 40 a 50 °C se colocó en tubos estériles, a razón de 5mL, en forma de pico de flauta y se tapó los tubos con corchos estériles.
- Con ayuda de la aguja de inoculación, esterilizada tocar un clon y sembrar en zic-zac en el tubo.
- Luego se incubó a 35°C por 24 horas.
- Transcurrido el tiempo de incubación se realizó las lecturas correspondientes.

El resultado es positivo cuando el microorganismo crece y alcaliniza el medio virando su coloración de verde a azul. Es negativo si no se observa crecimiento y el medio permanece verde. (GARCÍA, et al, 1997, p.31).

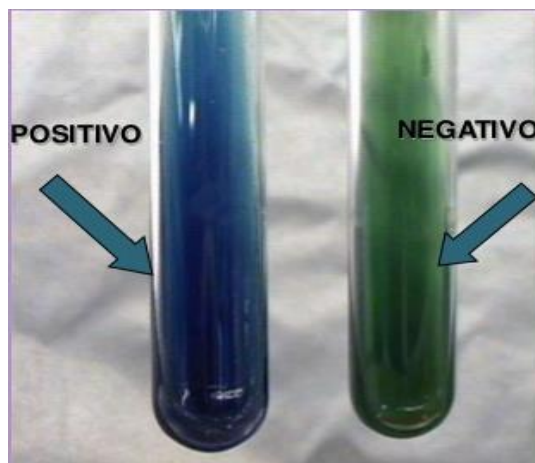


Figura 6-2: Prueba en el medio Citrato

Fuente: Forbes Betty, 2009

2.3.4.4. SIM

Determina la presencia de la enzima triptofanasa en bacterias, la cual se encarga de degradar el aminoácido triptófano a indol, manifestado por la aparición de un anillo rojizo debido a que el reactivo de Kovac reacciona con el indol, también se puede detectar la movilidad y producción de ácido sulfhídrico. (FORBES, et al, 2009, p.96).

- Se preparó el medio SIM (30g en 1L de agua destilada), la cantidad de tubos necesarios.
- Se calentó con ayuda de un reverbero, con agitación frecuente y hervir hasta que se disuelva totalmente.
- Se esterilizó en la autoclave a 121°C por 15 minutos.
- Cuando el medio está a una temperatura de 40 a 50 °C se colocó en tubos estériles, a razón de 5mL, en forma vertical y se tapó los tubos con corchos estériles.
- Con ayuda de la aguja de inoculación, esterilizada tocar un clon y sembrar por punción en el tubo.
- Luego se incubó a 35°C por 24 horas. Al culminar el tiempo de incubación se añadió 5 gotas del reactivo de Kovac al medio y se agito suavemente
- Transcurrido el tiempo de incubación se realizó las lecturas correspondientes.
- Se realizó las lecturas correspondientes.

Cepas móviles: producen turbidez del medio, que se extiende más allá de la línea de siembra.

Cepas inmóviles: el crecimiento se observa solamente en la línea de siembra. Cepas SH2 positivas: ennegrecimiento a lo largo de la línea de siembra o en todo el medio.

Cepas SH2 negativas: el medio permanece sin cambio de color.

Cepas indol positivas: desarrollo de color rojo luego de agregar el reactivo de Kovac.

Cepas indol negativas: sin cambio de color.

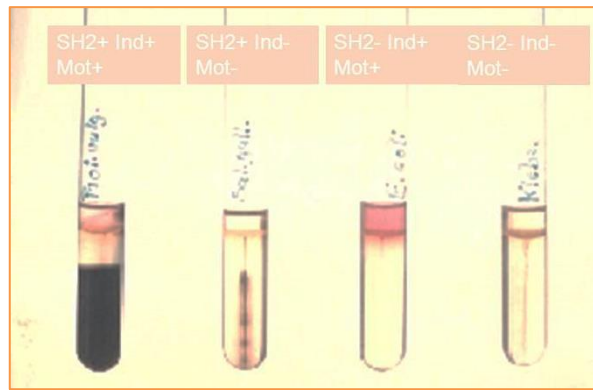


Figura 7-2: Prueba en el medio SIM

Fuente: Forbes Betty, 2009

2.3.5. Pruebas de Confirmación realizadas a los clones puros seleccionados

2.3.5.1. Agar Manitol

Medio de cultivo usado para *Staphylococcus*, porque posee un elevado contenido de sal el cual inhibe el crecimiento del resto de bacterias.

- Se preparó el agar Manitol Salado la cantidad necesaria. (108 g del polvo en 1 L de agua destilada).
- Se calentó con ayuda de un reverbero, con agitación frecuente y hervir hasta que se disuelva totalmente.
- Se esterilizó en la autoclave a 121°C por 15 minutos.
- Cuando el medio está a una temperatura de 40 a 50 °C se colocó a razón de 20 mL en cajas petri estériles y se dejó reposar hasta su solidificación
- Con ayuda de un asa de platino esterilizada se tomó una pequeña muestra de cada uno de los clones puros
- Se realizó un estriado en la superficie del medio y posteriormente se incubó a 35°C por 24 horas.
- Se realizó las lecturas correspondientes. (FORBES, et al, 2009, p.96).

Coagulasa positivo. - producen colonias amarillas con zonas amarillas, si es coagulasa negativo se producen colonias rojas o ligeramente rosadas sin provocar ningún cambio en el medio. Si se fermenta el manitol el indicador rojo fenol cambia a amarillo. (FORBES, et al, 2009, p.96).

2.3.5.2. Agar MacConkey

Agar primario, selectivo y diferencial permite el desarrollo de muchos tipos de bacilos Gram (-). El indicador de pH rojo neutro, le otorga a este medio su propiedad diferencial. (FORBES, et al, 2009, p.96).

- Se preparó el agar MacConkey la cantidad necesaria. (50 g del polvo en 1 L de agua destilada).
- Se calentó con ayuda de un reverbero, con agitación frecuente y hervir hasta que se disuelva totalmente.
- Se esterilizó en la autoclave a 121°C por 15 minutos.
- Cuando el medio está a una temperatura de 40 a 50 °C se colocó a razón de 20 mL en cajas petri estériles y se dejó reposar hasta su solidificación
- Con ayuda de un asa de platino esterilizada se tomó una pequeña muestra de cada uno de los clones puros
- Se realizó un estriado en la superficie del medio y posteriormente se incubó a 35°C por 24 horas.
- Se realizó las lecturas correspondientes. (FORBES, et al, 2009, p.96).

La fermentación bacteriana de la lactosa determina la formación de ácido, lo que disminuye el pH del medio y hace que el indicador rojo neutro les confiera a las colonias bacterianas un color rosado a rojo. Las bacterias no fermentadoras de la lactosa, como las especies de *Shigella*, permanecen incoloras y translúcidas (FORBES, et al, 2009, p.96).

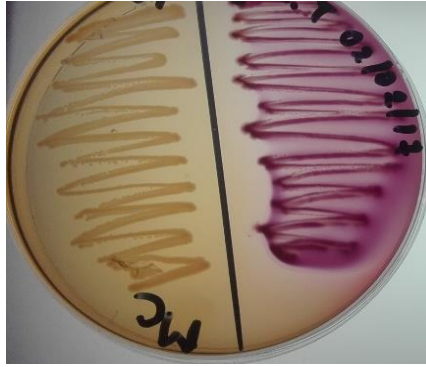


Figura 8-2: Crecimiento en Agar MacConkey

Fuente: Laura Tierra, 2017

2.3.5.3. Agar *Salmonella Shigella*

Medio altamente selectivo y diferencial, diseñado para el aislamiento de *Salmonella* y *Shigella*, la inhibición de las bacterias del grupo coliforme así como de Gram (+), se logra con la mezcla de sales biliares, citrato de sodio, tiosulfato de sodio y verde brillante. Además tiene incorporado lactosa como carbohidrato y rojo neutro como indicador de pH. (CAVALLINI, et al. 2009, p 63).

- Se preparó el agar *Salmonella-Shigella* la cantidad necesaria. (60 g del polvo en 1 L de agua destilada).
- Se calentó con ayuda de un reverbero, con agitación frecuente y hervir hasta que se disuelva totalmente.
- Se esterilizó en la autoclave a 121°C por 15 minutos.
- Cuando el medio está a una temperatura de 40 a 50 °C se colocó a razón de 20 mL en cajas petri estériles y se dejó reposar hasta su solidificación
- Con ayuda de un asa de platino esterilizada se tomó una pequeña muestra de cada uno de los clones puros
- Se realizó un estriado en la superficie del medio y posteriormente se incubó a 35°C por 24 horas.
- Se realizó las lecturas correspondientes.

Si forman colonias translúcidas o incoloras con un centro negro (producción de gas silhídrico) el resultado es positivo. Las bacterias fermentadoras de lactosa que logran crecer en el medio, forman colonias rojizas y mucoides. (CAVALLINI, et al. 2009, p 63).

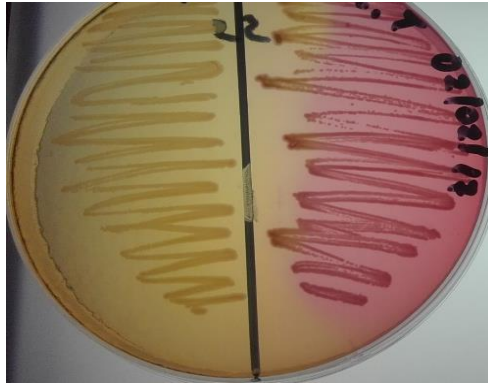


Figura 9-2: Crecimiento en Agar Salmonella Shigella

Fuente: Laura Tierra, 2017

2.3.5.4. Agar Eosina Azul de Metileno (E.M.B)

Este agar denominado E.M.B (por sus siglas en inglés) es un medio selectivo y diferencial que inhibe el crecimiento de bacterias Gram positivas, permite diferenciar entre las colonias de organismos fermentadores de lactosa y aquellos que no la fermentan. (FORBES, et al, 2009, p.97).

- Se preparó el agar Eosina Azul de Metileno la cantidad necesaria. (37,5 g del polvo en 1 L de agua destilada).
- Se calentó con ayuda de un reverbero, con agitación frecuente y hervir hasta que se disuelva totalmente.
- Se esterilizó en la autoclave a 121°C por 15 minutos.
- Cuando el medio está a una temperatura de 40 a 50 °C se colocó a razón de 20 mL en cajas petri estériles y se dejó reposar hasta su solidificación
- Con ayuda de un asa de platino esterilizada se tomó una pequeña muestra de cada uno de los clones puros
- Se realizó un estriado en la superficie del medio y posteriormente se incubó a 35°C por 24 horas.
- Se realizó las lecturas correspondientes. (FORBES, et al, 2009, p.97).

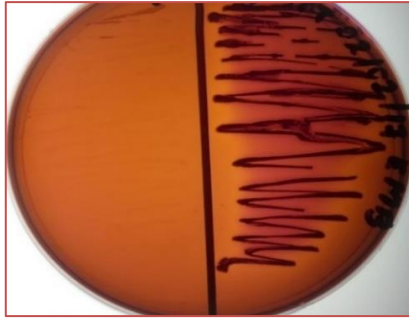


Figura 10-2: Crecimiento en Agar E.M.B

Realizado por: Laura Tierra, 2017

2.3.6 Identificación bacteriana

La identificación de los clones aislados se realizó mediante las lecturas de la tinción Gram, pruebas bioquímicas y pruebas confirmatorias. Para la identificación de género y especie de la familia *Enterobacteriaceae*, a más de las pruebas antes mencionadas también se utilizó el esquema mostrado en la figura 11-2.

	KLIGLER											
	Glucosa	Gas/glucosa	Lactosa	SH ₂	Citrato	Fenilalanina desaminasa	Indol	Lisina decarboxilasa	Manitol	Movilidad	Ureasa	
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	-	-	-	+	+	+	V ⁺	-	
<i>Escherichia coli</i> inactivo	+	-	V ⁻	-	-	-	+	V	+	-	-	
<i>Shigella dysenteriae</i>	+	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	
<i>Shigella flexneri</i>	+	-	-	-	-	-	V	-	+	-	-	
<i>Shigella boydii</i>	+	-	-	-	-	-	V ⁻	-	+	-	-	
<i>Shigella sonnei</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
<i>Edwardsiella tarda</i>	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	
<i>Klebsiella ozaenae</i> (1)	+	V	V ⁻	-	V ⁻	-	-	V	+	-	V ⁻	
<i>Klebsiella rhinoscleromatis</i> (1).....	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	
<i>Enterobacter cloacae</i>	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	V ⁺	
<i>Enterobacter aerogenes</i>	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	
<i>Enterobacter agglomerans</i>	+	V ⁻	V	-	V	V ⁻	V ⁻	-	+	V ⁺	V ⁻	
<i>Enterobacter gergoviae</i>	+	+	V	-	+	-	-	+	+	+	+	
<i>Enterobacter sakazakii</i>	+	+	+	-	+	V	V ⁻	-	+	+	-	
<i>Serratia marcescens</i>	+	V	-	-	+	-	-	+	+	+	V ⁻	
<i>Serratia liquefaciens</i>	+	V	V ⁻	-	+	-	-	V ⁺	+	+	-	
<i>Serratia rubidaea</i>	+	V	+	-	+	-	-	V	+	V ⁺	-	
<i>Morganella morganii</i>	+	V ⁺	-	-	-	+	+	-	-	+	+	
<i>Proteus mirabilis</i>	+	V ⁺	-	+	V ⁺	+	-	-	-	+	+	
<i>Proteus vulgaris</i>	+	V ⁺	-	+	V ⁻	+	+	-	-	+	+	
<i>Providencia alcalifaciens</i>	+	V ⁺	-	-	+	+	+	-	-	+	-	
<i>Providencia rettgeri</i>	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	
<i>Providencia stuartii</i>	+	-	V ⁺	-	+	+	+	-	-	+	V ⁻	

Figura 11-2: Características de especies de la familia Enterobacteriaceae

Fuente ÁLVAREZ., y BOQUET. 1990. p.74

2.3.7 Resistencia Bacteriana (Antibiograma)

Es un método de estudio in vitro del comportamiento de los antimicrobianos frente a los agentes infecciosos. Esta prueba se realizó mediante el método Kirby-Bauer, donde, se ubica un disco de papel filtro que contiene un antimicrobiano sobre una placa de Agar Mueller Hinton con previa inoculación de un microorganismo, la función del disco es inhibir el crecimiento del microorganismo inoculado. (GARCÍA, et al, 1997, p. 111).

Para realizar el antibiograma de los clones puros se procedió de la siguiente manera:

- En la cámara de flujo laminar, con un hisopo esterilizado, se tomó una colonia y se suspendió en un tubo con suero fisiológico.
- Se eliminó el exceso de suspensión de las paredes del tubo.
- Se realizó estrías en el medio Mueller Hinton en toda la superficie.
- Posteriormente se colocó los discos con ayuda de una pinza metálica esterilizada asegurándose que los discos se queden fijados al medio.
- Los discos colocados fueron 9 para mejor interpretación en las lecturas de los halos.
- Se incubó a 37°C durante 24 h y posteriormente se midió los halos de inhibición formados.

La tendencia actual es la de hacer una valoración binaria, clasificando a los microorganismos como sensibles o resistentes según el diámetro de la zona de inhibición sea mayor o menor que el diámetro crítico; las respuestas intermedias que expresan una sensibilidad moderada quedan incluidas dentro de las resistentes, para no inducir a error terapéutico. (GARCÍA, et al, 1997, p. 111).



Figura 12-2: Antibiograma

Fuente: Laura Tierra, 2017

CAPITULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE LA TEMPERATURA Y EL pH.

Tabla 1-3: Resultados de la determinación de la temperatura y el pH.

PARAMETRO	VALOR			PROMEDIO
	A	B	C	
Temperatura °C	19	19	18	18.7
pH	7.5	7.5	7.5	7.5
T. ambiente °C	16			

Realizado por: Laura Tierra, 2017

En la tabla 1-3 se observan los resultados de la temperatura y el pH de la fuente El Ejido. La temperatura promedio de esta fuente es 18.7°C y la temperatura ambiente se encuentra en 16°C; por lo tanto, se evidencia que existe una diferencia de 2.7°C entre la temperatura de la fuente y la temperatura del ambiente, la diferencia de temperatura según Chabier puede deberse a la profundidad de la cual emerge el agua, al gradiente geotérmico de la fuente y la rapidez con la que puede alcanzar la superficie, porque cuanto más rápido alcance la superficie menos pérdidas de calor tendrá; según Burbano las aguas frías tienen temperaturas menores a 20°C, la temperatura promedio de la fuente El Ejido al ser 18.7°C corresponde a una agua fría (BURBANO, et al. 2014.).

En la tabla 1-3 los valores de pH obtenidos en todos los casos es 7.5, esto quiere decir que la fuente posee un pH ligeramente básico, lo cual coincide con lo descrito por Burbano, quien indica un pH de 7,8 en el agua del Balneario Los Elenes, el mismo que se encuentra muy cerca de la fuente El Ejido (BURBANO, et al. 2014.). El valor de pH se debe a la composición química, sobre

todo al equilibrio carbónico y a la actividad de los microorganismos acuáticos. En cuanto al pH Madigan menciona que cada especie tiene un intervalo de pH para crecer, y la mayoría de bacterias crecen a un pH entre 5.5 y 8. (MADIGAN, et al, 1998, p 3). Por consiguiente, en esta fuente pueden desarrollarse gran variedad de microorganismos.

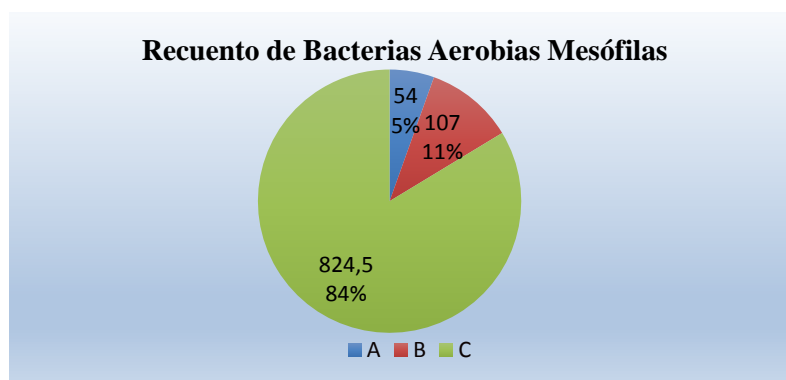
3.2 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

3.2.1 *Análisis de Bacterias Aerobias Mesófilas*

Tabla 2-3: Recuento de Bacterias Aerobias Mesófilas de la Fuente “El Ejido”

LUGAR DE MUESTREO		UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS UFC/mL	MEDIA	MEDIA	VARIANZA (S ²)	DESVIACIÓN ESTÁNDAR (S)
A	M1	18	54	80.5	2592	50,9
	M2	90			200	14,1
B	M1	117	107		81204,5	284,9
	M2	97				
C	M1	623	824,5	81204,5	284,9	
	M2	1026				
TOTAL		1971		452.5	164970,7	406,1

Realizado por: Laura Tierra, 2017



Gráfica 1-3: Recuento de Bacterias Aerobias Mesófilas de la Fuente “El Ejido”

Realizado por: Laura Tierra, 2017

En la tabla 2-3 y la gráfica 1-3 se observa que en los sitios de muestreo (A, B y C), existen diferencias en el crecimiento bacteriano, el menor crecimiento de bacterias aerobias mesófilas fue en el sitio A con un 5% (54), seguido por el sitio B con un 11% (107), y finalmente el sitio C con un 84% (824,5).

Al comparar el sitio A y B se observa que el crecimiento de bacterias aerobias mesófilas en el sitio B es dos veces mayor al crecimiento en el sitio A, esto puede deberse a que el sitio A es el punto de surgencia del agua y tiene muy poco contacto con el medio ambiente razón por la cual se genera un bajo porcentaje (5%) de crecimiento bacteriano en relación al sitio B que se encuentra cercano al ojo de agua pero tiene más contacto con el medio ambiente y por esta razón puede generar más crecimiento de bacterias aerobias mesófilas (11%).

El sitio C al ser comparado con los sitios A y B (16%, 80,5), se observa que el porcentaje de crecimiento de bacterias aerobias mesófilas en C (84%, 824,5) es mucho mayor que en A y B, la diferencia en el crecimiento puede deberse a que el agua del sitio C tiene un recorrido de aproximadamente 50 metros de A y B, lo que representa una mayor exposición del agua al medio ambiente y puede ser fácilmente contaminada, otra causa puede ser el hecho de que el agua al llegar al sitio C queda estancada y con poca fluidez propiciando así un ambiente adecuado para el crecimiento de bacterias aerobias mesófilas.

Ocaña en un estudio microbiológico realizado al balneario Los Elenes reporta 0,5 UFC/mL en el punto de surgencia y 83 UFC/mL en la piscina (Ocaña, 2015, p 57); estos datos son bajos comparados con nuestro estudio, la marcada diferencia de A y B en relación al punto de surgencia de Los Elenes puede ser debido a que el punto de surgencia del agua de Los Elenes se encuentra al interior de una cueva lo cual proporciona cierta protección, mientras que en nuestro caso el punto de surgencia está en contacto con el medio ambiente, lo mismo sucede si relacionamos los datos de la piscina con el sitio C de nuestro muestreo.

Apella y Araujo mencionan que las bacterias aerobias mesófilas determinan la seguridad y efectividad de la cloración en el tratamiento de aguas, debido a la alta sensibilidad que las bacterias aerobias mesófilas poseen frente al cloro. (APELLA & ARAUJO, 2015, p 48).

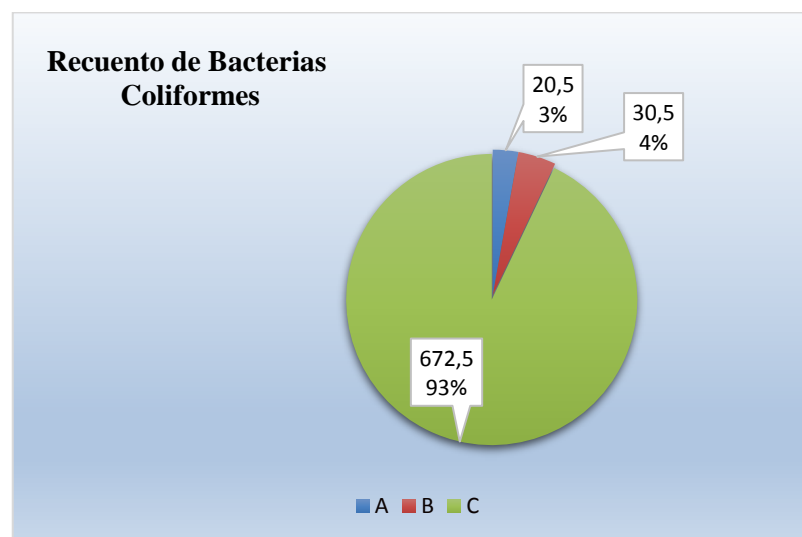
El agua de la fuente El Ejido no tiene ningún tipo de tratamiento y se encuentra expuesta al medio ambiente (animales, vegetación, ser humano), razón por la cual se observa el crecimiento de bacterias aerobias mesófilas en los tres sitios de muestreo.

3.2.2 Análisis de Bacterias Coliformes

Tabla 3-3: Recuento de Bacterias Coliformes de la fuente “El Ejido”

LUGAR DE MUESTREO		UNIDADES FORMADORAS DE COLONIA UFC/mL	MEDIA	MEDIA	VARIANZA (S ²)	DESCIACIÓN ESTÁNDAR (S)
A	M1	23	20,5	25,5	12,5	3,5
	M2	18				
B	M1	21	30,5		180,5	13,4
	M2	40				
C	M1	457	672,5	92880,5	304,7	
	M2	888				
TOTAL		1447		349	130263,7	360,9

Realizado por: Laura Tierra, 2017



Gráfica 2-3 Recuento de Bacterias Coliformes de la fuente “El Ejido”

Realizado por: Laura Tierra, 2017

En la tabla 3-3 y en la gráfica 2-3 se muestran los resultados del recuento de bacterias coliformes de la fuente El Ejido, los resultados indican que existe un promedio de 349 UFC/mL de crecimiento en los tres sitios de muestreo (A, B y C), el crecimiento de Coliformes en el sitio A y B corresponde al 3% (20,5) y 4% (30,5) respectivamente, mientras que en el sitio C el crecimiento es elevado (93%, 672,5) en comparación al sitio A y B que tienen un total de 7% de bacterias coliformes.

Prescott menciona que los coliformes son bacterias que se encuentran de manera natural en suelo y plantas, y por lo general no causan daño a la salud humana (PRESCOTT, et al, 2002, p 704), la fuente El Ejido al ser un área natural y estar rodeada de flora resulta adecuada para el crecimiento de bacterias coliformes en el agua, como se observa en los resultados de la gráfica 2-3.

Otra causa para que existan coliformes en el agua según la North Carolina Public Health (NCPH) puede ser porque la lluvia arrastra las bacterias depositadas por diversas fuentes en el suelo (heces fecales, actividad humana, etc.) y las transportan hasta el agua (NCPH, 2009), obteniéndose mayor número de bacterias en el punto C debido a que allí se almacena el agua y a la presencia de animales y humanos.

Ocaña en la evaluación del balneario Los Elenes reporta un promedio de bacterias coliformes de 0 UFC/mL en el punto de surgencia y 14.5 UFC/mL en la piscina (Ocaña, 2015, p 58); mientras que en nuestro caso se obtuvo un promedio de 349 UFC/mL de crecimiento en los tres sitios de muestreo (A, B y C), al ser Los Elenes un balneario debe tener medidas de desinfección y bioseguridad que disminuyan la presencia de coliformes en el agua, en tanto que la fuente El Ejido no tiene ninguna medida ni protección para evitar la presencia de coliformes, como ya se mencionó anteriormente deben provenir de los animales y humanos que la frecuentan.

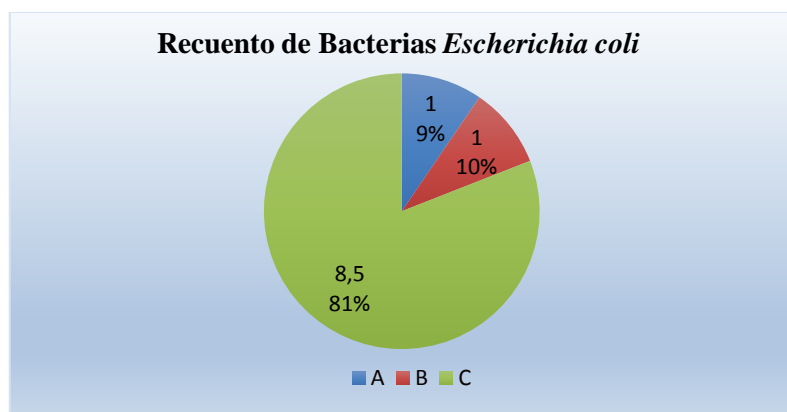
Según la Norma Mexicana NOM-127-SSA1 de agua para uso y consumo humano el límite permisible de coliformes totales es de 2 UFC/100mL de agua (NOM, 1994), de acuerdo a esta norma se puede decir que el agua de la fuente El Ejido no es apta para consumo humano ya que excede el límite permisible.

3.2.3 Análisis de Bacterias *E. coli*

Tabla 4-3: Recuento de Bacterias *E. coli* de la Fuente “El Ejido”

LUGAR DE MUESTREO		UNIDADES FORMADORAS DE COLONIA UFC/mL	MEDIA	MEDIA	VARIANZA (S ²)	DESCIACIÓN ESTÁNDAR (S)
A	M1	1	1	1	0	0
	M2	1				
B	M1	0	1	1	2	1,41
	M2	2				
C	M1	5	8,5	8,5	24,5	4,95
	M2	12				
TOTAL		21		4,75	20,3	4,51

Realizado por: Laura Tierra, 2017



Gráfica 3-3: Recuento de Bacterias *E. coli* de la Fuente “El Ejido”

Realizado por: Laura Tierra, 2017

En la tabla 4-3 se observan los resultados del recuento de bacterias *E. coli* de la fuente El Ejido, los resultados indican que existe un promedio de 4,75 UFC/mL de crecimiento en los tres sitios de muestreo (A, B y C), el crecimiento de *E. coli* en el sitio A y B corresponde al 9% y 10% respectivamente, como se puede observar en la gráfica 3-3 ambos sitios tienen similar crecimiento bacteriano (1), mientras que en el sitio C el crecimiento es elevado (81%, 8,5) en comparación al sitio A y B que tienen un total de 19% de crecimiento de bacterias *E. coli*.

Según la Norma Mexicana NOM-127-SSA1 de agua para uso y consumo humano el límite permisible de coliformes fecales (*E. coli*) es de 0 UFC/100mL de agua (NOM, 1994), la norma técnica ecuatoriana NTE INEN 1108. 2014 de agua potable, requisitos menciona que en 100mL de agua no debe existir presencia de coliformes fecales (INEN, 2014).

Ocaña en la evaluación del balneario Los Elenes reporta un promedio de 0 UFC/mL en el punto de surgencia y 4.5 UFC/mL en la piscina (Ocaña, 2015, p 58) datos que no coinciden con nuestro trabajo ya que se obtuvo un promedio de 1 UFC/mL en el sitio de surgencia (A, B) y 8,5 UFC/mL en el sitio C, dejando en claro que el agua de la fuente no debería ser usado sin antes darle una adecuada protección y tratamiento.

Almedariz al realizar la evaluación microbiológica del Parque de las Fuentes (Guano- Ecuador) menciona una media de 4 UFC/mL en el punto de surgencia (Almedariz, 2017) dato que difiere significativamente con nuestro trabajo en donde se obtuvo un promedio de 1 UFC/mL en el sitio de surgencia y 8,5 UFC/mL en el sitio C.

El crecimiento de *E. coli* en los sitios antes mencionados puede deberse a que la fuente El Ejido se encuentra en una zona natural, rodeada de vegetación, está en contacto directo con el ser humano y además existe pastoreo de animales (ovino, bovino y equino) que defecan en los alrededores, y como se sabe *E. coli* es una bacteria que está presente en las heces de animales y del hombre, por esta razón puede generar contaminación de la fuente El Ejido, al ser el sitio C más extenso que A y B se encuentra en mayor contacto con el ser humano y animales por ello existe un mayor crecimiento de *E.coli*.

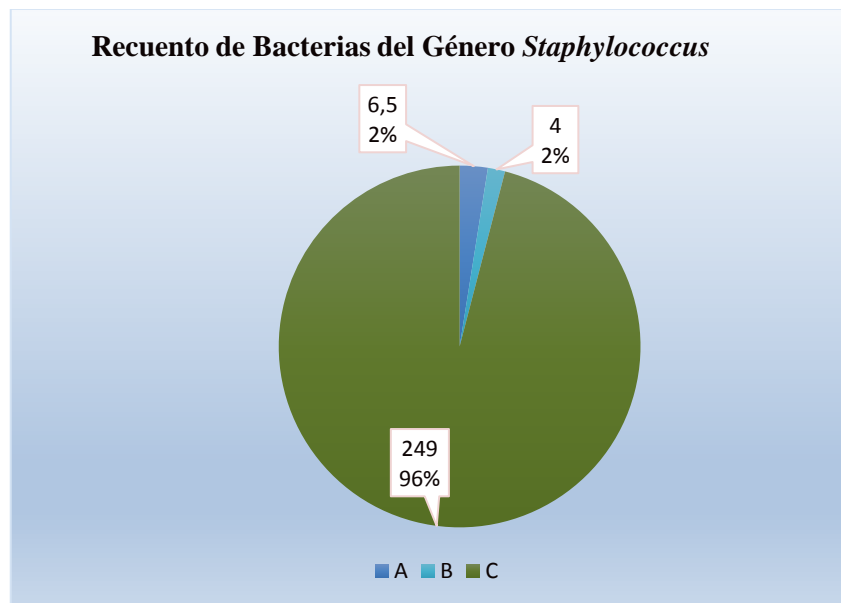
Según Prescott, *E. coli* es una bacteria que se encuentra en el intestino de animales y su presencia en agua indica contaminación fecal, por lo tanto, este tipo de bacterias son consideradas patógenas e indican que existe un elevado riesgo sanitario. (PRESCOTT, et al, 2002, p 704), debido a la presencia de *E.coli* en la fuente El Ejido se puede decir que esta agua no es apta para consumo humano ya que no esta potabilizada y además presenta *E. coli*, el mayor riesgo sanitario esta en el sitio C, ya que se encuentra en contacto directo con el ser humano y como ya se mencionó anteriormente en ese sitio es donde existe un alto valor de crecimiento bacteriano, 8.5 UFC/mL. .

3.2.4 *Análisis de Bacterias del género Staphylococcus.*

Tabla 5-3: Recuento de Bacterias del género *Staphylococcus* de la Fuente “El Ejido”

LUGAR DE MUESTREO		UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS UFC/mL	MEDIA	MEDIA	VARIANZA (S ²)	DESVIACIÓN ESTÁNDAR (S)
A	M1	4	6,5	5,25	12,5	3,5
	M2	9				
B	M1	1	4			
	M2	7				
C	M1	372	249	30258	173,9	
	M2	126				
TOTAL		519		127,1	21902,7	147,9

Realizado por: Laura Tierra, 2017



Gráfica 4-3: Recuento de Bacterias del Género *Staphylococcus* de la Fuente “El Ejido”

Realizado por: Laura Tierra, 2017

En la tabla 4-3 se indica un promedio de crecimiento de 127,1 UFC/mL, los mismos que se desarrollaron en la placa petrifilm para *Staphylococcus*.

Staphylococcus es un género patógeno que se encuentra relativamente extendido en el medio ambiente, siendo su presencia más notable en la piel y mucosas de animales, por lo que puede ser liberado por contacto humano en medios acuáticos o por contacto con animales, (TORTORA, et al, 2007, p.4).

Ocaña al evaluar el balneario Los Elenes reportó un promedio de 0 UFC/mL en el punto de surgencia y 2 UFC/mL en la piscina (Ocaña, 2015, p 59) datos que no coinciden con este trabajo ya que se obtuvo un promedio de 5,25 UFC/mL en el sitio de surgencia (A, B) y 249 UFC/mL en el sitio C. Las diferencias mencionadas pueden deberse al contacto con el medio ambiente y animales, que, en el caso del balneario Los Elenes es nulo, mientras que en nuestro caso existe contacto tanto con el medio ambiente como con animales.

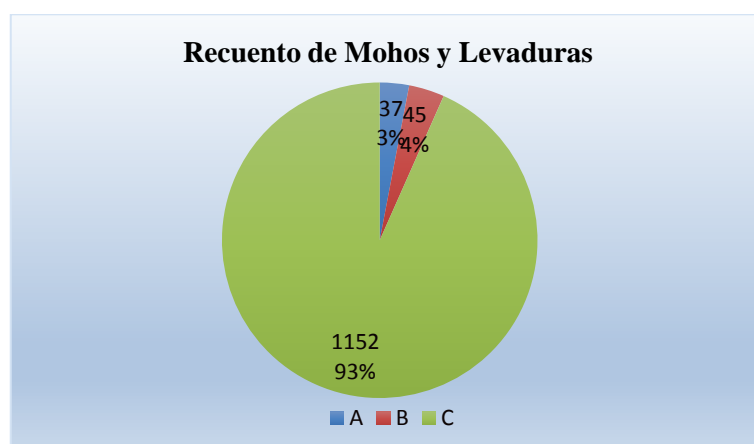
En cuanto al porcentaje de crecimiento de *Staphylococcus* en cada lugar de toma de muestra, se puede observar en la gráfica 4-3 que el mayor crecimiento ocurre en C, seguido por B y finalmente A con un porcentaje de crecimiento de 96% (6.5), 2% (4) y 2% (249) respectivamente, la razón por la que en el sitio de surgencia (B y A) existe menor porcentaje de crecimiento (4%) de *Staphylococcus* puede deberse a que no existe un contacto directo con humanos o animales, mientras que en C ocurre todo lo contrario ya que es el sitio que se encuentra en contacto directo con el ser humano y animales.

3.2.5 Análisis de Mohos y Levaduras

Tabla 6-3: Recuento de Mohos y Levaduras de la Fuente “El Ejido”

LUGAR DE MUESTREO		UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS UFC/mL			MEDIA	MEDIA	VARIANZA (S ²)	DESVIACIÓN ESTÁNDAR (S)	
		Mohos	Lev	Total					
A	M1	1	42	43	37	41	72	8,5	
	M2	2	29	31					
B	M1	3	39	42	45		18		4,2
	M2	3	45	48					
C	M1	22	1134	1156	1152	32	5,6		
	M2	23	1125	1148					
TOTAL		54	2414	2468		596,5	329189,5	573,7	

Realizado por: Laura Tierra, 2017



Gráfica 5-3: Recuento de Mohos y Levaduras de la Fuente “El Ejido”

Realizado por: Laura Tierra, 2017

La cantidad promedio de UFC/mL que se muestran en la tabla 6-3 es de 596,5 UFC/mL, que corresponde a la microbiota de mohos y levaduras de la fuente El Ejido.

El crecimiento de mohos y levaduras en agua no es muy frecuente, pero un estudio realizado por María Campoverde y Fanny González en el agua de la Parroquia Baños (Cuenca - Ecuador) encontraron 584 colonias entre mohos y levaduras de los cuales 433 fueron de levaduras y 151

mohos, (CAMPOVERDE & GONZÁLEZ, 2012, p. 1,2), en este trabajo se encontró 1207 UFC/mL de levaduras y 27 UFC/mL de mohos, como se evidencia existe mayor numero levaduras y menor número de mohos en comparación al número encontrado en la parroquia Baños.

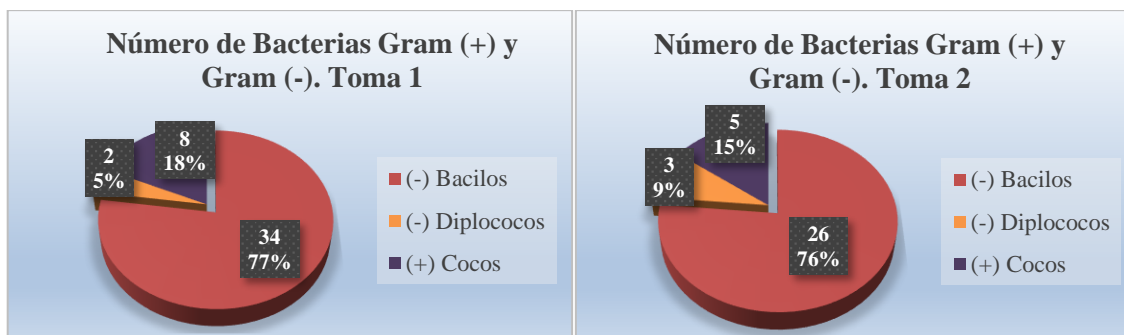
Según Doadrio la presencia de mohos y levaduras en su estudio realizado al balneario el Raposo indica que la mayoría de estos microorganismos están presentes en el suelo, pero se pueden adaptar al agua, (DOADRIO, 2013, p.67-68), por lo tanto, se podría decir que la presencia de mohos y levaduras en los sitios de muestreo A con un 3% (37), B con un 4% (45) y C con un 93% (1152) se debe a la presencia de ellos en el suelo y vegetación que se encuentra alrededor de la fuente.

3.2.6 *Análisis del número de Bacterias aisladas de la Fuente “El Ejido”*

Tabla 7-3: Número de Bacterias Gram Positivas y Gram Negativas aisladas de la Fuente “El Ejido”

Bacteria		Toma 1 (UFC/mL)	Toma 2 (UFC/mL)	Media	Varianza (S ²)	Desv. Estándar (S)
Gram (-)	Bacilos	34	26	30	32	5,6
	Cocos	0	0	0	0	0,0
	Diplococos	2	3	2,5	0,5	0,7
Gram (+)	Bacilos	0	0	0	0	0,0
	Cocos	8	5	6,5	4,5	2,1
	Diplococos	0	0	0	0	0,0
Aislados impuros		6	7	6,5	0,5	0,7

Realizado por: Laura Tierra, 2017



Gráfica 6-3: Número de bacterias Gram Positivas y Gram Negativas aisladas de la Fuente “El Ejido”

Realizado por: Laura Tierra, 2017

A partir de la población bacteriana aislada en los tres sitios de colecta (A, B y C) se aislaron al azar 91 clones, tratando de obtener representantes de todos los tipos bacterianos encontrados, de los cuales 65 clones (83%) corresponden a bacilos y cocos Gram negativos y 13 clones (17%) a cocos Gram positivos como se puede observar en la tabla 7-3, estos datos coinciden con un estudio realizado por Mosso en el manantial mineromedicinal del Balneario Cervantes que se encuentra en España, en el cual se indica que la microbiota aislada, en su mayoría, son clones Gram negativos (56.0%) y en menor proporción clones Gram positivos (38.6%) . (MOSSO; et al, 2006, p. 285-287).

Ocaña al evaluar el balneario Los Elenes reportó que la mayor parte de clones aislados corresponden a Gram negativos 67% (6 clones) y Gram positivos 33% (3 clones) (Ocaña, 2015, p 62), esto a manera general coincide con lo encontrado en este trabajo donde el mayor porcentaje de bacterias aisladas corresponden a bacterias Gram negativas (83%) y solo un 17% a bacterias Gram positivas.

Como se puede observar en la gráfica 6-3 la microbiota de la fuente El Ejido está formada principalmente por bacilos Gram negativos con un 76,9%, seguidas de clones cocos Gram positivos con un 16,7% y finalmente se encuentran los clones diplococos Gram negativos con un 6,4%, estos datos en proporción son similares a los datos reportados por Mosso, quien en su estudio al manantial mineromedicinal del Balneario Cervantes (España) reportó la existencia de bacilos Gram negativos 56,0% y cocos Gram positivos 14,6%. (MOSSO; et al, 2006, p.287). De acuerdo a lo anteriormente mencionado se demuestra que la microbiota de esta agua se encuentra constituida principalmente por bacilos Gram negativos.

3.2.7 Análisis de descripción macroscópica de colonias aisladas de la Fuente “El Ejido”

Tabla 8-3: Descripción macroscópica de colonias aisladas de la Fuente “El Ejido”

Código (Bacteria Aislada)	Petrifilm	en Descripción petrifilm	Descripción macroscópica							
			Forma	Bordes	Elevación	Superficie	Consistencia	Luz transmitida	Color	Tamaño (mm)
CM1-6	AC	Roja	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Cremosa	Traslucida	Amarilla	2
CM1-8	AC	Roja	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Cremosa	Traslucida	Blanca	3
CM1-11	AC	Roja	Circular	Filamentoso	No elevada	Rugosa	Cremosa	Opaca	Amarilla	3
CM1-13	AC	Roja	Circular	Filamentoso	No elevada	Lisa	Cremosa	Traslucida	Hueso	3
CM1-15	EC	Violeta	Circular	Filamentoso	No elevada	Lisa	Cremosa	Traslucida	Blanca	2
CM1-19	EC	Violeta	Circular	Filamentoso	No elevada	Rugosa	Cremosa	Traslucida	Blanca	2
CM1-21	EC	Violeta con gas	Circular	Filamentoso	No elevada	Lisa	Cremosa	Opaca	Blanca	2
CM1-23	EC	Violeta con gas	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Cremosa	Opaca	Amarilla	3
CM1-26	EC	Roja	Circular	Entero	No elevada	Rugosa	Cremosa	Traslucida	Blanca	1
CM1-28	EC	Roja	Circular	Entero	No elevada	Lisa	Cremosa	Traslucida	Amarilla	1
CM1-30	EC	Violeta con gas	Ovalado	Entero	Elevada	Lisa	Cremosa	Traslucida	Hueso	2
CM1-34	EC	Violeta con gas	Ovalado	Entero	No Elevada	Rugosa	Cremosa	Traslucida	Blanca	4
CM1-36	EC	Roja	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Cremosa	Opaca	Amarilla	3
CM1-41	EC	Roja	Circular	Entero	No Elevada	Lisa	Cremosa	Traslucida	Hueso	1

CM1-43	EC	Violeta	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Cremosa	Opaca	Blanca	4
CM1-6	STX	Negra	Circular	Entero	No Elevada	Lisa	Cremosa	Opaca	Amarilla	2
CM1-8	STX	Negra	Circular	Entero	No Elevada	Lisa	Cremosa	Opaca	Amarilla	1
CM1-15	STX	Azul verdosa	Circular	Entero	No Elevada	Lisa	Cremosa	Traslucida	Hueso	1
CM1-19	STX	Verde	Circular	Entero	No Elevada	Lisa	Cremosa	Traslucida	Blanca	1
CM1.21	STX	Verde	Circular	Entero	No Elevada	Lisa	Cremosa	Opaca	Amarilla	1
AM1-23	EC	Roja	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Cremosa	Opaca	Hueso	3
AM1-26	EC	Roja	Circular	Entero	No Elevada	Rugosa	Cremosa	Opaca	Blanca	3
AM1-28	EC	Roja	Circular	Entero	No Elevada	Lisa	Cremosa	Traslucida	Hueso	3
AM1-30	EC	Roja	Circular	Entero	No Elevada	Lisa	Cremosa	Traslucida	Blanca	3
AM1-34	EC	Roja	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Cremosa	Traslucida	Blanca	4
AM1-36	EC	Roja	Circular	Entero	No Elevada	Lisa	Cremosa	Traslucida	Hueso	4
AM1-41	EC	Roja	Circular	Entero	No Elevada	Lisa	Cremosa	Opaca	Blanca	3
AM1-43	EC	Roja	Circular	Entero	No Elevada	Lisa	Cremosa	Traslucida	Blanca	3
CM1-30	STX	Azul verdosa	Circular	Entero	Elevada	Rugosa	Cremosa	Opaca	Amarilla	2
CM1-36	STX	Verde	Circular	Entero	No Elevada	Lisa	Cremosa	Traslucida	Blanca	1
CM1-43	STX	Negra	Circular	Entero	No Elevada	Lisa	Cremosa	Opaca	Amarilla	2
AM1-6	AC	Roja	Circular	Entero	No Elevada	Lisa	Cremosa	Opaca	Blanca	3
AM1-8	AC	Roja	Circular	Entero	No Elevada	Lisa	Cremosa	Opaca	Blanca	3
AM1-13	AC	Roja	Circular	Entero	No Elevada	Lisa	Cremosa	Opaca	Blanca	2
BM1-15	AC	Roja	Circular	Entero	Elevada	Rugosa	Cremosa	Opaca	Hueso	5

BM1-19	AC	Roja con gas	Circular	Entero	No Elevada	Lisa	Cremosa	Opaca	Blanca	2
BM1-21	AC	Roja	Circular	Entero	No Elevada	Lisa	Cremosa	Opaca	Amarilla	3
BM1-23	AC	Roja con gas	Circular	Entero	Elevada	Rugosa	Cremosa	Opaca	Hueso	5
BM1-26	AC	Roja	Circular	Entero	No Elevada	Lisa	Cremosa	Opaca	Blanca	2
BM1-28	AC	Roja	Circular	Entero	No Elevada	Lisa	Cremosa	Opaca	Blanca	1
BM1-6	EC	Roja	Circular	Entero	No Elevada	Lisa	Cremosa	Traslucida	Blanca	3
CM1-8	EC	Roja	Circular	Entero	No Elevada	Lisa	Cremosa	Traslucida	Blanca	2
BM1-11	EC	Roja	Circular	Entero	No Elevada	Lisa	Cremosa	Opaca	Blanca	3
BM1-13	EC	Roja	Circular	Entero	No Elevada	Lisa	Cremosa	Traslucida	Hueso	2
BM1-15	EC	Roja	Circular	Entero	No Elevada	Lisa	Cremosa	Traslucida	Blanca	3
BM1-11	EC	Roja con gas	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Cremosa	Traslucida	Blanca	3
CM1-13	EC	Roja con gas	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Cremosa	Opaca	Amarilla	4
CM2-6	EC	Violeta con gas	Circular	Entero	No Elevada	Lisa	Cremosa	Opaca	Blanca	3
CM2-8	EC	Violeta con gas	Circular	Entero	No Elevada	Lisa	Cremosa	Opaca	Blanca	2
CM2-11	EC	Roja	Circular	Entero	No Elevada	Lisa	Cremosa	Traslucida	Blanca	4
CM2-13	EC	Roja	Circular	Entero	No Elevada	Lisa	Cremosa	Traslucida	Hueso	3
CM2-15	EC	Violeta	Circular	Entero	No Elevada	Lisa	Cremosa	Opaca	Blanca	3
CM2-19	EC	Violeta	Circular	Entero	No Elevada	Lisa	Cremosa	Traslucida	Hueso	2
CM2-21	EC	Roja	Circular	Entero	No Elevada	Lisa	Cremosa	Traslucida	Blanca	3
CM2-23	EC	Violeta con gas	Circular	Entero	No Elevada	Lisa	Cremosa	Opaca	Blanca	3
CM2-26	STX	Azul	Circular	Entero	No Elevada	Lisa	Cremosa	Traslucida	Amarilla	2

CM2-28	STX	Azul	Circular	Entero	No Elevada	Lisa	Cremosa	Opaca	Amarilla	2
CM2-30	STX	Negro	Circular	Entero	No Elevada	Lisa	Cremosa	Opaca	Blanca	3
CM2-38	STX	Violeta	Circular	Entero	No Elevada	Lisa	Cremosa	Opaca	Hueso	2
CM2-41	STX	Violeta	Circular	Entero	No Elevada	Lisa	Cremosa	Opaca	Blanca	1
CM2-43	STX	Negra	Circular	Entero	No Elevada	Lisa	Cremosa	Opaca	Blanca	3
CM2-6	AC	Roja	Circular	Entero	Elevada	Rugoso	Cremosa	Opaca	Amarilla	3
CM2-8	AC	Roja	Circular	Entero	Elevada	Rugoso	Cremosa	Opaca	Amarilla	2
CM2-11	AC	Roja	Circular	Entero	No Elevada	Lisa	Cremosa	Opaca	Blanca	4
CM2-13	AC	Roja	Circular	Entero	No Elevada	Lisa	Cremosa	Opaca	Hueso	3
CM2-15	AC	Roja	Circular	Entero	No Elevada	Lisa	Cremosa	Opaca	Blanca	2
CM2-19	AC	Roja con gas	Circular	Entero	No Elevada	Lisa	Cremosa	Opaca	Amarilla	3
CM2-21	AC	Roja	Circular	Entero	No Elevada	Lisa	Cremosa	Traslucida	Blanca	3
CM2-23	AC	Roja con gas	Circular	Entero	No Elevada	Lisa	Cremosa	Opaca	Blanca	3
CM2-26	AC	Roja con gas	Circular	Entero	Elevada	Rugosa	Cremosa	Opaca	Blanca	2
CM2-28	AC	Roja	Circular	Entero	No Elevada	Lisa	Cremosa	Traslucida	Hueso	4
CM2-30	AC	Roja con gas	Circular	Entero	Elevada	Rugosa	Cremosa	Traslucida	Blanca	3
CM2-34	AC	Roja	Circular	Entero	Elevada	Rugoso	Cremosa	Opaca	Amarilla	2
AM2-6	EC	Violeta con gas	Circular	Entero	No Elevada	Lisa	Cremosa	Opaca	Amarilla	3
AM2-8	EC	Roja con gas	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Cremosa	Opaca	Amarilla	4
AM2-11	EC	Violeta	Circular	Entero	No Elevada	Lisa	Cremosa	Opaca	Blanca	3
AM2-13	EC	Violeta	Circular	Entero	No Elevada	Lisa	Cremosa	Opaca	Blanca	2

AM2-15	EC	Roja	Circular	Entero	No Elevada	Lisa	Cremosa	Opaca	Hueso	2
BM2-19	EC	Violeta	Circular	Entero	No Elevada	Lisa	Cremosa	Traslucida	Blanca	3
BM2-21	EC	Violeta con gas	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Cremosa	Traslucida	Amarilla	3
BM2-23	EC	Violeta con gas	Circular	Entero	No Elevada	Lisa	Cremosa	Traslucida	Amarilla	2
BM2-26	EC	Violeta	Circular	Entero	No Elevada	Lisa	Cremosa	Traslucida	Blanca	3
AM2-30	STX	Negra	Circular	Entero	No Elevada	Lisa	Cremosa	Opaca	Blanca	3
AM2-36	AC	Roja con gas	Circular	Entero	No Elevada	Lisa	Cremosa	Opaca	Blanca	3
AM2-38	AC	Roja con gas	Circular	Entero	No Elevada	Lisa	Cremosa	Opaca	Blanca	2
AM2-41	AC	Roja	Circular	Entero	No Elevada	Lisa	Cremosa	Opaca	Blanca	3
AM2-43	AC	Roja	Circular	Entero	No Elevada	Lisa	Cremosa	Traslucida	Blanca	4
AM2-21	STX	Verde	Circular	Entero	No Elevada	Lisa	Cremosa	Traslucida	Blanca	1
BM2-26	STX	Negra	Circular	Entero	No Elevada	Lisa	Cremosa	Opaca	Amarilla	2
BM2-28	STX	Verde	Circular	Entero	No Elevada	Lisa	Cremosa	Traslucida	Blanca	1
BM2-30	STX	Violeta	Circular	Entero	No Elevada	Lisa	Cremosa	Opaca	Hueso	1

Realizado por: Laura Tierra, 2017

AM: sitio A de muestreo; **BM:** sitio B de muestreo; **CM:** sitio C de muestreo; **AC:** Petrifilm para Aerobios; **EC:** Petrifilm para *E. coli*/ Coliformes; **STX:** Petrifilm para *Staphylococcus aureus*.

La morfología obtenida para los 91 clones aislados se muestra en la tabla 8-3 observándose que la morfología macroscópica fue: clones con forma circular (89) 97.8%, ovalada (2) 2.2%; de bordes filamentosos (5) 5.5% y enteros (86) 94.5%; tienen elevación un (20) 22% y no presentan elevación (71) un 78%; la superficie de estas bacterias es lisa (78) en un 85.7% y rugosa (13) en un 14.3%; su consistencia es cremosa en su totalidad, es decir, el 100% de las bacterias aisladas; la luz transmitida por estas bacterias es opaca (53) 58.2% y translúcida (38) 41.8%; en cuanto al color presentan coloraciones amarilla (23) en un 25.3%, blanca (51) en un 56% y hueso (17) en un 18.7% predominando en las colonias la coloración blanca; y finalmente el tamaño varía de 1mm

a 5mm, las colonias de 1mm (13) corresponde al 14.3%, las de 2mm (27) corresponde al 29.7%, las de 3mm (39) corresponde al 42.8%; las de 4mm (10) corresponde al 10.9% y las de 5mm (2) corresponde al 2.3%.

De acuerdo a esta evaluación macroscópica la morfología predominante de la fuente El Ejido son las bacterias de forma circular con bordes enteros sin elevación, con una superficie lisa, de consistencia cremosa, con luz transmitida opaca, de coloración blanca y con un tamaño de 3mm aproximadamente.

3.2.8 Análisis de las pruebas realizadas a los Clones Bacilos Gram Negativos

Del total de clones aislados, se seleccionaron 20 al azar para ser identificados, los resultados obtenidos se muestran en las tablas 9-3; 10-3 y 11-3.

Tabla 9-3: Pruebas Realizadas a los Clones Bacilos Gram Negativos

Código (Clon)	Petrifilm	Pruebas Bioquímicas												MacConkey	S-S	O.F		Movilidad	Bacteria	Porcentaje (%)
		Catalasa		Kligler				SIM			Citrate	Urea	E.M.B			Con tapa	Sin tapa			
		+	-	G	L	Gas	H ₂ S	Indol	Mov.	H ₂ S										
AM1-28 CLON 5	EC	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	C	C	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>	100
AM1-6 CLON 7	AC	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	C	C	-	+	+	-	<i>Escherichia coli</i>	90.9
AM2-6 CLON 18	EC	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	C	-	-	-	-	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	95
AM2-36 CLON 20	AC	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	C	SC	C	-	-	-	<i>Shigella spp</i>	81.8
BM1-15 CLON 8	AC	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	C	C	-	+	+	-	<i>Escherichia coli</i>	90.9
BM1-19 CLON 9	AC	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	SC	SC	-	+	+	+	<i>Proteus vulgaris</i>	90.9
BM2-21 CLON 19	EC	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	C	-	-	-	-	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	95

CM1-13 CLON 1	AC	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	SC	C	-	-	-	+	<i>Enterobacter aerogenes</i>	93.7
CM1-30 CLON 2	EC	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	C	C	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>	100
CM1-34 CLON 3	EC	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	C	C	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>	100
CM1-19 CLON 4	STX	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	C	SC	C	-	-	-	<i>Shigella spp.</i>	81.8
CM1-8 CLON 10	EC	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	C	C	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>	100
CM1-13 CLON 11	EC	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	C	C	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>	100
CM2-15 CLON 12	EC	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	SC	C	-	-	-	+	<i>Enterobacter aerogenes</i>	93.7
CM2-38 CLON 14	STX	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	C	-	-	-	-	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	95
CM2-15 CLON 16	AC	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	SC	SC	-	-	-	-	<i>Serratia spp</i>	90

Realizado por: Laura Tierra, 2017

AM: sitio A de muestreo; **BM:** sitio B de muestreo; **CM:** sitio C de muestreo; **G:** Glucosa; **L:** Lactosa; **Mov:** Movilidad; **E.M.B:** Eosina azul de metileno; **S-S:** Salmonella-Shigella; **SC:** Sin crecimiento; **C:** Crecimiento.

En la Tabla 9-3 se observan las pruebas realizadas para la identificación de los clones puros Bacilos Gram Negativos.

El mayor numero de clones identificados corresponden a *Escherichia coli* (7 clones), una bacteria perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, según (MADIGAN, et al, 1998, p. 376) estas bacterias son bacilos Gram Negativos no esporulados, no tienen movilidad y si lo tienen es por flagelos peritricos, son anaerobios facultativos, oxidasa negativa, fermentan glucosa y lactosa; mientras que (ÁLVAREZ, & BOQUET, 1990, p. 74) mencionan que estas bacterias fermentan glucosa y lactosa, producen gas, no producen ácido sulfhídrico, citrato y urea negativos, indol positivo y de movilidad variable, crecen en E.M.B y MacConkey y son O.F positivo, los clones identificados como *Escherichia coli* coinciden en un 100% y 90.9% con las características de bibliografía.

El siguiente grupo en importancia con 3 aislados fue *Pseudomona aeruginosa* (3 clones), esta bacteria de acuerdo a Koneman, pertenece a la familia *Pseudomonal*, es aerobia estricta, oxidasa y catalasa positivos, no fermenta glucosa ni lactosa, no produce gas, inmóvil, crece poco o nada en agar MacConkey, negativo en O.F (KONEMAN, et al, 2008, p.3). De acuerdo a las características

antes mencionadas se puede decir que coinciden en un 95% con los resultados obtenidos en el laboratorio.

Por los resultados que presentan los clones 1 y 12 se puede decir que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*, y en particular a *Enterobacter aerogenes*; esta bacteria es un bacilo Gram negativo, catalasa positiva, oxidasa negativa, anaerobia facultativa (MADIGAN, et al, 1998, p. 376). Fermenta glucosa, fermenta lactosa, produce gas, no produce ácido sulfhídrico, citrato positivo, urea negativo, indol negativo, movilidad positivo, (ÁLVAREZ, & BOQUET, 1990, p. 74), E.M.B negativo, MacConkey crecimiento y S-S negativo, los resultados obtenidos en el laboratorio coinciden en un 93.7% con las fuentes bibliográficas.

El clon 4 y 20 también pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*, en el análisis se pudo determinar que pertenecen al género *Shigella*, estas bacterias son catalasa positiva, oxidasa negativa, fermentan glucosa y lactosa, no producen gas, no producen H₂S, no tienen movilidad; indol, urea, citrato, E.M.B positivo y O.F negativo, (ÁLVAREZ, & BOQUET, 1990, p. 74), en el medio S-S se observó crecimiento, por estas razones se determinó que pertenecen al género *Shigella*.

Según los resultados obtenidos del clon 9 se puede decir que es una bacteria perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, concretamente a *Proteus vulgaris*; de acuerdo a (ÁLVAREZ, & BOQUET, 1990, p. 74), esta bacteria es anaerobia facultativa, oxidasa negativa, catalasa positiva, fermentadora de glucosa, no fermentadora de lactosa, móvil, produce gas y H₂S, citrato, indol y urea positiva, los datos anteriormente mencionados coinciden en un 90.9% con los resultados de la tabla 9-3 (Clon 9).

El clon 16 por los resultados obtenidos en el laboratorio se puede decir que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, específicamente al género *Serratia*, ya que al ser comparado con el cuadro de Álvarez y Boquet, mencionan que este género es oxidasa negativa, catalasa positiva, anaerobio facultativo, fermenta glucosa, la producción de gas y lactosa es variable, no producen H₂S, citrato positivo, indol negativo, movilidad positiva y urea negativa (ÁLVAREZ, & BOQUET, 1990, p. 74), los datos de laboratorio y bibliografía en un 90%, por lo tanto se puede admitir que el clon 16 es una bacteria del genero *Serratia*.

3.2.9 Análisis de las pruebas realizadas a los Clones Diplococos Gram Negativos

Tabla 10-3: Pruebas Realizadas a los Clones Diplococos Gram Negativos

Código (Clon)	Petrifilm	Catalasa	Oxidasa	Pruebas Bioquímicas									Movilidad	Bacteria	Porcentaje (%)	
				Kligler				SIM			Citrato	Urea				Manitol
				G	L	Gas	H ₂ S	Indol	Mov.	H ₂ S						
BM2-28 CLON 17	AC	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>Moraxella</i> <i>spp</i>	92.3
CM2-11 CLON 15	AC	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-		92.3

Realizado por: Laura Tierra, 2017

AM: sitio A de muestreo; BM: sitio B de muestreo; CM: sitio C de muestreo; G: Glucosa; L: Lactosa; Mov: Movilidad.

En la tabla 10-3 se muestran los resultados de las pruebas realizadas a los clones 15 y 17, estas bacterias pertenecen a la familia *Moraxellaceae*, específicamente al género *Moraxella*, Koneman, menciona que *Moraxella spp* es gram negativa cocobacilar, inmóvil, citocromo oxidasa y catalasa positivas, urea negativa, no fermentadores. (KONEMAN, et al, 2008, p. 328,333). Por las características antes mencionadas y los resultados obtenidos en el laboratorio se puede decir que se trata de una bacteria que pertenece al género *Moraxella* (92.3%), pero no se pudo determinar la especie.

3.2.10 Análisis de las pruebas realizadas a los Clones Cocos Gram Positivos

Tabla 11-3: Pruebas Realizadas a los Clones Cocos Gram Positivos

Código (Clon)	Petrifilm	Catalasa	Oxidasa	Pruebas Bioquímicas									Movilidad	Bacteria	Porcentaje (%)				
				Kligler				SIM			Citrato	Urea				Manitol	O.F		
				G	L	Gas	H ₂ S	Indol	Mov.	H ₂ S							Con tapa	Sin tapa	
CM1-30	STX	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-		80

CLON 6																		<i>Staphyloco</i>	
CM2-26	STX	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-		<i>ccus spp.</i>	73.3
CLON 13																			

Realizado por: Laura Tierra, 2017

G: Glucosa; L: Lactosa; Mov: Movilidad; O.F: Oxidación/ Fermentación.

En la tabla 11-3 se observa los resultados de los clones 6 y 13, estos pertenecen a la familia *Micrococaceae* en particular al género *Staphylococcus*; según Koneman este género de bacterias son cocos gram positivos, inmóviles, catalasa positivo, oxidasa negativo, al observarse en una tinción gram se observa como células simples, en pares, en tétradas y en cadenas cortas, pero aparecen en forma predominante en grupos como racimos, en su mayoría estas las especies son anaerobios facultativos, (KONEMAN, et al, 2008, p.595), urea positiva, manitol positivo, fermentan glucosa, (BAILÓN, et al, 2003, pp.159), los resultados de las pruebas realizadas mostraron con un 80% y 73.3% de coincidencia que los clones corresponden al género *Staphylococcus*.

3.2.11 Análisis de las bacterias identificadas en la fuente “El Ejido”

Tabla 12-3 Análisis de las bacterias identificadas en la fuente “El Ejido”

GÉNERO	ESPECIE
<i>Escherichia</i>	<i>Coli</i>
<i>Enterobacter</i>	<i>Aerogenes</i>
<i>Proteus</i>	<i>Vulgaris</i>
<i>Pseudomona</i>	<i>Aeruginosa</i>
<i>Shigella spp</i>	
<i>Serratia spp</i>	
<i>Moraxella spp</i>	
<i>Staphylococcus spp</i>	

Realizado por: Laura Tierra,2017

En la tabla 12-3 se muestran el género y especie de las bacterias identificadas en los tres sitios de muestreo (A, B y C) de la fuente El Ejido, las bacterias identificadas fueron, *Escherichia coli* (7), *Enterobacter aerogenes* (2), *Proteus vulgaris* (1) y *Pseudomona aeruginosa* (3), *Shigella spp* (2),

Serratia spp (1), *Moraxella spp* (2) y *Staphylococcus spp* (2), de las cuales 4 fueron identificadas hasta su especie, mientras que las demás se identificó solo su género.

- *Escherichia coli*: Es el indicador universal de contaminación fecal de agua, habita normalmente en el intestino de mamíferos y aves, si esta bacteria patógena se encuentra en el agua es un indicativo que esta ha tenido algún tipo de contaminación fecal, por lo cual constituye un riesgo para la salud de los humanos; la OMS indica que *E. coli* se transmite por el consumo de agua o alimentos contaminados causando infecciones en el tracto intestinal que generalmente son agudas y no presentan mayores complicaciones (OMS. 2016), excepto en niños y adultos con carencias nutricionales, entre los síntomas que produce están calambres abdominales, diarrea, en algunos casos diarrea sanguinolenta, fiebre y vómito (APELLA & ARAUJO, 2015, p 47).

La presencia de *E. coli* en la fuente El Ejido puede deberse a que la fuente se encuentra en una zona abierta sin protección alguna contra agentes contaminantes externos, otra causa puede ser porque en el lugar se da el pastoreo de animales (vacunos, ovinos, equinos), los cuales a través de sus heces contaminaron la fuente.

- *Enterobacter aerogenes*: esta bacteria forma parte del grupo de bacterias coliformes, está presente normalmente en el tracto gastrointestinal (microflora), también habita en el suelo, agua y en algunos productos lácteos. Causa infecciones en las vías respiratorias menores, infecciones cutáneas, infecciones del tracto urinario, endocarditis, infecciones intrabdominales, artritis séptica, osteomielitis e infecciones en los ojos, las infecciones a causa de esta bacteria surgen por la flora de los propios pacientes, sin embargo, puede ocurrir infección cruzada, ya sea a través de las manos, alimentos y agua. (KONEMAN, et al, 2008, p.839).

Enterobacter aerogenes se identificó en el sitio C de muestreo de la fuente El Ejido, su presencia puede deberse a que esta bacteria probablemente se encuentre en el suelo o en los seres humanos que utilizan el agua, lo cual puede producir una contaminación de *Enterobacter aerogenes* en el agua.

- *Proteus vulgaris*: esta bacteria se puede encontrar en el intestino del hombre y varios animales, en aguas servidas, en el agua, en la tierra y materia fecal. Esta bacteria puede causar infecciones urinarias, debido a que produce ureasa (enzima que desdobla la urea) la urea de la orina se descompone en CO₂ y NH₃ que es tóxico para las células y provoca irritaciones del epitelio urinario, también puede producir enteritis, neumonía, otitis media, meningitis, es invasor de infecciones nosocomiales, heridas y quemaduras. (PAMBABAY, 2015, p 56).

La fuente EL Ejido al estar en contacto con el hombre, animales, tierra y materia fecal resulta un lugar que puede ser fácilmente contaminado por *Proteus vulgaris*, y como se puede observar en la tabla 9-3 se identificó un *Proteus vulgaris* en el sitio B de muestreo.

- *Pseudomona aeruginosa*: Se trata de una bacteria patógena oportunista. Son comunes en el suelo y agua, también puede estar presente en heces humanas y animales, puede sobrevivir durante mucho tiempo en medio acuoso a temperatura ambiente, al ser esta una bacteria patógena oportunista es causante de infecciones de piel, oído y ojos. (ARCOS; et al, 2005, p.74). Al ser una bacteria patógena (alóctona), su control debe ser obligatorio para cualquier tipo de aguas, Apella menciona que esta bacteria es resistente al cloro, y por esta razón es usada como un indicador en la eficiencia de la cloración. (APELLA & ARAUJO, 2015, p 46).

La presencia de *Pseudomona aeruginosa* en el agua de la fuente El Ejido puede deberse a que esta bacteria es común en el suelo, heces y agua, ambiente que predomina en el lugar; otra causa puede ser porque el agua no recibe ningún tipo de tratamiento antes de ser usada razón por la cual es susceptible a contaminación y proliferación de un sinnúmero de bacterias.

- *Shigella spp*: Las bacterias que pertenecen a este género son causantes de una enfermedad diarreica conocida como shigelosis, o disentería bacilar, esta enfermedad se produce por una reacción inflamatoria aguda del tracto digestivo causada por cuatro especies del género *Shigella*. En todo el mundo se producen unas 600000 muertes anuales a causa de la disentería bacilar, puede ser transmitido por vía fecal- oral, a través de dedos, alimentos, moscas y excretas, afecta más a niños entre uno y cuatro años de edad. La dosis infectiva mínima es de tan sólo 10 a 100 bacterias. (PRESCOTT, et al, 2002, p. 1010).

El género *Shigella* al ser un patógeno relacionado con el agua, puede desarrollarse a partir de aguas residuales, residuos agrícolas y fauna que está presente alrededor de la fuente El Ejido, en este trabajo se identificó a 2 clones pertenecientes a este género, por lo tanto, pueden ser una amenaza para la población que hace uso de la fuente.

- *Serratia spp*: este género de bacterias coliformes habitan el tracto intestinal de mamíferos y aves, también están presentes en plantas y pequeños animales, los microorganismos de este género pueden existir como saprofitas independientes, o como microorganismos intestinales, las bacterias del género *Serratia* no son indicadores de contaminación fecal, puede producir infecciones urinarias, infecciones nosocomiales e infecciones en vías aéreas superiores. (APELLA & ARAUJO, 2015, p 48).

La presencia de esta bacteria en la fuente puede deberse a la diversidad de flora y fauna existente en la fuente, la misma que puede contminar al agua con esta bacteria, la presencia de *Serratia spp* tambien puede deberse a la falta de proteccion que existe en los sitios de muestreo y en los alrededores de estos.

- *Moraxella spp*: Las especies que pertenecen al género *Moraxella* y son consideradas de importancia clínica son *M. lacunata*, *M. nonliquefaciens*, *M. osloensis*, *M. atlantae* y *M. catarrhalis*, estas especies de constituyen la flora normal de superficies mucosas y son considerados como bacterias de bajo potencial patogénico. Estas bacterias se encuentran más a menudo en el aparato respiratorio, es poco frecuente en el aparato genital y, en ocasiones, producen infección sistémica. (KONEMAN, et al, 2008, p.334). Su presencia en la fuente puede estar asociada al contacto que existe entre la población que tiene *Moraxella spp* y el agua, a pesar de su bajo potencial patogénico se debería realizar un control de estas bacterias para que no lleguen a causar daños en la salud de la población.
- *Staphylococcus spp*: El género *Staphylococcus* se puede encontrar en ambientes como: el suelo, el agua y en una variedad de productos alimenticios; su hábitat natural es la piel de los mamíferos, aunque también puede estar presente en la garganta, tracto intestinal y boca. En las personas causa infecciones agudas, piogénicas y superficiales, aunque también puede producir, con menor frecuencia, infecciones profundas como osteomielitis, neumonía y endocarditis aguda. (SEIJA, 2008, p. 257).

Al ser el agua y el suelo el ambiente de *Staphylococcus spp*, se puede decir que esta bacteria pudo haberse desarrollado fácilmente en la fuente El Ejido, en este trabajo se identificó a 2 clones en el sitio C de muestreo lo cual puede dar lugar a la producción de infecciones en la población, ya que el sitio C es el que tiene mayor contacto con la población, por esta razón se debería controlar el crecimiento bacteriano de este y los demás microorganismos para evitar daños en la salud de la población que hace uso de la fuente.

Los resultados obtenidos al identificar los aislados bacterianos seleccionados indican una alta prevalencia de bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, lo cual está mostrando un importante nivel de contaminación fecal en la fuente.

3.3 ANTIBIOGRAMAS

La evaluación del efecto de antibióticos seleccionados sobre los clones aislados e identificados se muestra en las tablas 13-3, 14-3 y 15-3.

3.3.1 Análisis de Antibiógramas de Clones Bacilos Gram Negativos

Tabla 13-3: Antibiógrama de los Clones Bacilos Gram Negativos de la Fuente “El Ejido”

# CLON	BACTERIA	ANTIBIÓTICOS								
		Ceftriaxona (30µg)	Trimetoprim/sulfametoxazol (1.25µg)	Ciprofloxacino (5µg)	Kanamicina (30µg)	Amoxicilina+Ac.Clavulánico (30/10µg)	Estreptomina (10µg)	Imipenem (10µg)	Ampicilina (10µg)	Gentamicina (10µg)
CLON 2	<i>Escherichia coli</i>	S	S	S	S	S	S	S	R	S
CLON 3	<i>Escherichia coli</i>	S	S	S	S	S	R	S	R	R
CLON 5	<i>Escherichia coli</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CLON 7	<i>Escherichia coli</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CLON 8	<i>Escherichia coli</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CLON 10	<i>Escherichia coli</i>	S	S	S	R	R	R	R	R	R

CLON 11	<i>Escherichia coli</i>	S	S	S	R	R	R	R	R	S
CLON 1	<i>Enterobacter aerogenes</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CLON 12	<i>Enterobacter aerogenes</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CLON 14	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	S	S	S	R	S	R	S	R	R
CLON 18	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	S	S	S	S	R	S	S	R	S
CLON 19	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CLON 4	<i>Shigella spp.</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CLON 20	<i>Shigella spp</i>	R	S	S	S	S	S	S	S	S
CLON 9	<i>Proteus vulgaris</i>	R	S	S	S	R	S	S	R	S
CLON 16	<i>Serratia spp</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Realizado por: Laura Tierra, 2017

S: Sensible; **R:** Resistente

En la tabla 13-3 se muestra el resultado de los antibiogramas realizados a los clones bacilos Gram negativos observándose que todas las bacterias (*Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris* y *Pseudomona aeruginosa*, *Shigella spp*, *Serratia spp*) presentaron sensibilidad a los antibióticos Trimetoprim/sulfametoxazol y Ciprofloxacino.

Los clones 10 y 11, de *Escherichia coli* que fueron aislados del sitio C de muestreo son los que presentaron una mayor resistencia a los antibióticos evaluados, en el caso del clon 11 presentó resistencia a kanamicina, amoxicilina + ácido clavulánico, estreptomina, Imipenem, Ampicilina, y en el caso del clon 10 además de los antibióticos antes mencionados también fue resistente al antibiótico Gentamicina.

Mosquito et al, reporta que *Escherichia coli* tiene altos porcentajes de resistencia hacia ampicilina, Trimetoprim-sulfametoxazol, Kanamicina, Estreptomina, por lo cual genera complicaciones en el tratamiento antibiótico, la resistencia antibiótica se debe a mutaciones a nivel cromosómico o transferencia horizontal de material genético, la resistencia a amoxicilina-ácido clavulánico es un indicador de resistencia a múltiples antibióticos, en general la mayor incidencia de resistencia se da en enterobacterias, (MOSQUITO, et al. 2011, p. 648), y en el caso del presente trabajo también se encontró resistencia de enterobacterias (*E. coli*).

En un estudio realizado a diversos artículos internacionales por Clara Varela en el 2007. menciona que existe resistencia de *Escherichia coli* frente a Imipenem y Gentamicina. (VARELA,

2007, p.45). lo cual coincide con lo encontrado en este estudio para el clon 10, mientras que en el caso del clon 11 solo presentó resistencia a Imipenem.

En el caso de *Enterobacter aerogenes* (clones 1 y 12) se observa que presenta sensibilidad frente a los 9 antibióticos usados, lo que indica que estas bacterias pueden ser tratadas con cualquiera de estos antibióticos y también que estas bacterias que están presentes en la fuente El Ejido no desarrollaron ninguna forma de resistencia hasta el momento.

En el caso de *Pseudomona aeruginosa* fueron aislados 3 clones con comportamiento diferente. El clon 19 mostró sensibilidad a todos los antibióticos usados, mientras que el clon 14 presentó resistencia a los antibióticos Kanamicina, estreptomycin, ampicilina y Gentamicina; el clon 18 presentó resistencia a amoxicilina + ácido Clavulánico y ampicilina.

KONEMAN, menciona que el tratamiento de infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* es difícil, debido a que solo un espectro estrecho de antibióticos es eficaz, esta bacteria puede portar plásmidos de multiresistencia y esta característica conlleva a la aparición de cepas multiresistentes, como en el caso del clon 14 el cual mostró resistencia a los antibióticos kanamicina, estreptomycin, ampicilina y Gentamicina y el clon 18 mostró resistencia a los antibióticos amoxicilina + ácido clavulánico y ampicilina, este hecho puede generar un problema al momento de proporcionar un tratamiento eficaz contra las infecciones causadas por esta bacteria.

El género *Shigella spp* corresponde a los clones 4 y 20, los mismos que fueron aislados del sitio C y A del muestreo respectivamente, en la tabla 12-3 se observa que el clon 4 es sensible frente a los 9 antibióticos usados, mientras que el clon 20 presentó resistencia frente a Ceftriaxona.

Proteus vulgaris corresponde al clon 9, fue aislado del sitio B de muestreo, y si observamos el cuadro 13-3 esta bacteria presenta resistencia frente a Ceftriaxona, amoxicilina-ácido clavulánico y ampicilina. Según VARELA, (2007) menciona que esta bacteria puede presentar resistencia a Ceftriaxona debido a mutaciones en los genes reguladores, mientras que KONEMAN, (2015) menciona que *Proteus vulgaris* presenta una resistencia natural a ampicilina, y que la resistencia a amoxicilina-ácido clavulánico se debe a se debe a la presencia de penicilinasas plasmídicas.

La bacteria que pertenece al género *Serratia spp* corresponde al clon 16 y fue aislada del sitio C de muestreo; como se puede observar en la tabla 13-3 esta bacteria presentó sensibilidad frente todos los antibióticos usados, lo cual es un buen indicativo de que esta bacteria aislada de la fuente El Ejido no ha generado ningún tipo de resistencia antibiótica hasta el momento.

La evaluación general de la resistencia de los clones bacilos Gram negativos a los antibióticos utilizados muestra que el antibiótico Trimetoprim/sulfametoxazol y Ciprofloxacino son los más efectivos ya que ninguno de los microorganismos evaluados mostró resistencia, mientras que en el otro extremo está la ampicilina quien mostró sensibilidad sobre 9 de los 16 clones evaluados.

3.3.2 Análisis de Antibiogramas de Clones *Diplococos Gram Negativos*

Tabla 14-3: Antibiograma de los Clones *Diplococos Gram Negativos* de la Fuente “El Ejido”

# CLON	BACTERIA	ANTIBIÓTICOS								
		Ceftriaxona (30µg)	Trimetoprim/sulfametoxazol (1,25µg)	Amoxicilina+Ac. Clavulánico (30/10µg)	Kanamicina (30µg)	Ciprofloxacino (5µg)	Estreptomina (10µg)	Imipenem (10µg)	Ampicilina (10µg)	Gentamicina (10µg)
CLON 15	<i>Moraxella spp</i>	S	S	R	R	S	R	R	R	R
CLON 17	<i>Moraxella spp</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Realizado por: Laura Tierra, 2017

S: Sensible; R: Resistente

En la tabla 14-3 se muestra el resultado de los antibiogramas realizados a los clones *diplococos Gram negativos*, pertenecientes al género *Moraxella spp*.

Se puede observar que el clon 17 proveniente del sitio B de muestreo presenta sensibilidad frente a todos los antibióticos usados, mientras que el clon 15 proveniente del sitio C de muestreo

presenta resistencia a 6 de los 9 antibióticos utilizados (Amoxicilina + Ác. Clavulánico, Kanamicina, Estreptomicina, Imipenem, Ampicilina y Gentamicina).

Koneman menciona que el género *Moraxella* es sensible a antimicrobianos como Gentamicina, Ciprofloxacino, Amoxicilina + Acido Clavulánico, Imipenem y Trimetoprim/sulfametoxazol. (KONEMAN, et al, 2008, p.952), esto coincide con el clon 17, pero en el caso del clon 15 presenta resistencia a los antibióticos antes mencionados excepto para Trimetoprim/sulfametoxazol.

En un estudio realizado por Guevara en Perú para determinar la resistencia de los patógenos respiratorios a diferentes antimicrobianos se analizaron cepas del genero *Moraxella* las cuales presentaron sensibilidad a los antibióticos Ciprofloxacino, Eritromicina, Gentamicina, Ceftriaxona y Ampicilina, estos resultados coinciden con lo obtenido en este estudio para el clon 17, mientras que para el clon 15 solo se observó sensibilidad ante Ceftriaxona, Trimetoprim/sulfametoxazol y Ciprofloxacino. (GUEVARA, 2004, p. 17).

3.3.3 Análisis de Antibiogramas de Clones Cocos Gram Positivos

Tabla 15-3: Antibiograma de los Clones Cocos Gram Positivos de la Fuente “El Ejido”

# CLON	BACTERIA	ANTIBIÓTICOS								
		Ceftriaxona (30µg)	Kanamicina (30µg)	Amoxicilina+Ac.Clavulánico (30/10µg)	Imipenem (10µg)	Ciprofloxacino (5µg)	Ampicilina (10µg)	Eritromicina (15µg)	Vancomicina (30µg)	Gentamicina (10µg)
CLON 6	<i>Staphylococcus spp</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CLON 13	<i>Staphylococcus spp</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Realizado por: Laura Tierra, 2017

S: Sensible; R: Resistente

En la tabla 15-3 se muestra los antibiogramas de los clones 6 y 13 que pertenecen al género *Staphylococcus spp*, ambos clones provienen del sitio C de muestreo y como se puede observar presentaron sensibilidad frente a todos los antibióticos usados (Ceftriaxona, Trimetoprim/sulfametoxazol, Amoxicilina + Ác. Clavulánico, Kanamicina, Ciprofloxacino, Eritromicina, Imipenem, Vancomicina y Gentamicina).

Guevara en un estudio realizado en Perú reportó que *Staphylococcus spp* presenta sensibilidad a Vancomicina, Gentamicina, Ciprofloxacino, Trimetoprim/sulfametoxazol y Eritromicina, (GUEVARA, 2004, p. 17), lo cual coincide con lo encontrado en nuestro caso para los clones 6 y 13.

Mientras que Koneman menciona que *Staphylococcus* es resistente al antibiótico Imipenem y Ceftriaxona datos que no coinciden con lo encontrado en este trabajo. Esto se explica por la gran variedad genotípica y fenotípica que puede ser encontrada para las diferentes especies bacterianas.

Los resultados obtenidos para los microorganismos aislados en el presente estudio indican que en la fuente El Ejido existen bacterias y en particular enterobacterias multiresistentes, lo cual podría constituir un riesgo sanitario para las personas que utilizan la fuente debido a que podrían contaminarse con bacterias patógenas difíciles de controlar con los antibióticos normalmente utilizados.

CONCLUSIONES

La evaluación microbiológica de la fuente mostró crecimiento de bacterias en todos los sitios de muestreo (A, B sitio 1 y C sitio 2) y en todos los medios evaluados, el mayor porcentaje de crecimiento bacteriano fue en el sitio C con un 84% y el 16% restante corresponde al sitio 1 (A, B).

El 83% (65 clones) de la microbiota que se aisló de la fuente corresponde a bacterias Gram negativas, siendo la mayor parte bacilos Gram negativos con un 89,3% (58 clones) y solo un 10.7% diplococos Gram negativos (7 clones); el 17% restante fueron identificadas como bacterias Gram positivas (13 clones).

De los 91 clones aislados fueron identificados 20: y de ellos la mayor proporción correspondió a *Escherichia coli* con un 35%, *Pseudomona aeruginosa* 15%, *Enterobacter aerogenes* 10%, *Moraxella spp* 10%, *Shigella spp* 10%, *Staphylococcus spp* 10%, *Proteus vulgaris* 5% y *Serratia spp* 5%.

Desde el punto de vista sanitario, el agua de la fuente presenta bacterias indicadoras de contaminación fecal (*Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris*), y microorganismos patógenos (*Serratia spp*, *Shigella spp*, *Pseudomona aeruginosa*, *Moraxella spp*, *Staphylococcus spp*), que pueden causar infecciones agudas y/o graves constituyendo así un riesgo sanitario para la población que hace uso de esta agua.

La evaluación de la resistencia a antibióticos mostró que *Enterobacter aerogenes*, y *Serratia spp* aisladas de la fuente son sensibles a todos los antibióticos (Ceftriaxona, Trimetoprim/sulfametoxazol, Ciprofloxacino, Kanamicina, Amoxicilina + Ác Clavulánico, Estreptomina, Imipenem, Ampicilina y Gentamicina); *Staphylococcus spp* también fue sensible a todos los antibióticos usados (Ceftriaxona, Kanamicina, Amoxicilina+Ac.Clavulánico, Imipenem, Ciprofloxacino, Ampicilina, Eritromicina, Vancomicina y Gentamicina).

Se observó que en el caso de *Escherichia coli* los clones 10 y 11 presentaron resistencia a 6 antibióticos (Kanamicina, amoxicilina + Ácido Clavulánico, estreptomina, Imipenem, Ampicilina, y Gentamicina), en el caso de *Moraxella spp* el clon 15 también presentó resistencia a 6 antibióticos (Amoxicilina + Ác. Clavulánico, Kanamicina, Estreptomina, Imipenem, Ampicilina y Gentamicina), *Pseudomona aeruginosa* presentó resistencia a 5 antibióticos (Kanamicina, amoxicilina + Ácido Clavulánico, estreptomina, Ampicilina, y Gentamicina), *Shigella spp* mostró resistencia a Ceftriaxona y *Proteus vulgaris* mostró resistencia a Ceftriaxona, amoxicilina + Ácido Clavulánico y ampicilina.

Los patrones de resistencia/sensibilidad mostrados por los clones aislados en el presente estudio indican que existen bacterias como *Escherichia coli*, *Moraxella spp* resistentes a 6 de los antibióticos usados, o *Pseudomona aeruginosa* la cual presentó resistencia a 5 de los antibióticos usados, por lo tanto el uso del agua de la fuente El Ejido constituye un riesgo de salud para la población, por lo que si se pretende utilizar dicha fuente para consumo humano debe tomarse las medidas necesarias para garantizar la eliminación de la microbiota encontrada.

RECOMENDACIONES

Se recomienda continuar con el estudio para lograr la caracterización completa de los géneros que no pudieron ser identificados en este trabajo de Titulación.

Es necesario extender este estudio realizando una evaluación de la fuente, en diferentes épocas del año, para determinar cómo varía la carga microbiana de la fuente.

Realizar periódicamente evaluaciones microbiológicas con el objetivo de controlar la carga bacteriana de la fuente, debido a que esta agua es usada por la población para el aseo e incluso para consumo humano.

Se recomienda al Gobierno Autónomo Descentralizado del cantón Guano socializar estos resultados a la población que hace uso de esta fuente con el fin de dar a conocer y buscar soluciones para prevenir infecciones que pueden producirse por las bacterias encontradas en la fuente El Ejido.

BIBLIOGRAFÍA

ÁLVAREZ, María, & BOQUET, Ernesto. *Manual de Técnicas en Microbiología Clínica.* Segunda. Madrid-España. Garsi. 1990. pp. 74.

ASOCIACIÓN DE MUNICIPALIDADES ECUATORIANAS (AME). Cantón Guano. [En línea]. [Consulta: 22 Febrero 2017.]. Disponible en: <http://www.ame.gob.ec/ame/index.php/ley-de-transparencia/65-mapa-cantones-del-ecuador/mapa-chimborazo/263-canton-guano>.

ANDUEZA, F. Microbiología del agua. Facultad de Farmacia y Bioanálisis [En línea] [Consulta: Octubre 2014]. Disponible en: [http://www.cff.org.br/userfilesmicrobiol %C3%B3gicos %20para%20garantizar%20la%20calidad%20del%20agua.pdf](http://www.cff.org.br/userfilesmicrobiol%20para%20garantizar%20la%20calidad%20del%20agua.pdf).

APELLA M, ARAUJO P. Microbiología de agua. Conceptos básicos pp. 33-48. [Consulta: 16 Diciembre 2015.]. Disponible en: http://www.psa.es/es/projects/solarsafewater/documents/libro/02_Capitulo_02.pdf.

ARCOS, Mireya, et al. *Indicadores microbiológicos de contaminación de las fuentes de agua.* Vol. III. 2005. Cundinamarca-España. pp. 69-78.

BAILÓN, Lucía; et al. *Atlas de pruebas Bioquímicas para identificar bacterias.* México D.F-México. Universidad Autónoma de México 2003. pp. 12-159.

BARROW. G, & FELTHAM. R. Cowan and steel's manual for identification of medical bacteria. 3ª ed. Cambridge-Inglaterra. Cambridge University Press. 2003. pp. 123, 130, 198-200.

BURBANO Napoleón, et al. "La hidrogeología del Ecuador"*Agua termominerales en el Ecuador.* [En línea] 2014. [Consulta: 13 Marzo 2017.]. Disponible en: <https://issuu.com/inamhi/docs/termalismo>.

CAMPOVERDE TOROMORENO, María José & GONZÁLEZ MIRANDA, Fanny Esther.
[En línea] (Tesis) (Pregrado) Universidad de Cuenca. Bioquímica y Farmacia. Cuenca.
Ecuador. 2012. pp.1-2 [Consulta: 28 Febrero 2017.]. Disponible en: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/2472/1/tq1115.pdf>.

CARBAJAL, Á & GONZÁLEZ, M. "Propiedades y funciones biológicas del agua". *Agua para la salud, pasado, presente y futuro*. 2012. España. pp 63-77.

CAVALLINI, Evelyn, et al. "Bacteriología General" *Principios y Prácticas de Laboratorio*, 2009. Costa Rica. pág. 63.

DE LA ROSA, M & MOSSO, M. "*Diversidad microbiana de las aguas minerales*". Panorama actual de las Aguas Minerales y Mineromedicinales en España. n° 43 2000. España. pp 153-157.

DOADRIO, Antonio. Real Academia Nacional de Farmacia. "Balnearios de España". *Aguas Minerales y Mineromedicinales*. Vol. 11. 2013. Madrid-España. pp.67-68.

FORBES, Betty, et, al. *Bailey & Scott Diagnostico Microbiológico*. Doceava Buenos Aires-Argentina. Médica Panamericana, 2009. pp. 96-97.

GARCÍA, Pedro; et al. *Microbiología Clínica Aplicada*. Tercera. Madrid-España: Diaz de Santos S.A, 1997. pp. 29-31, 111.

GOUMH. Agotamiento de asa. [En línea], [Consulta: 28 de Enero de 2017.]. Disponible en: <https://goumh.umh.es/practicas-de-microbiologia/indice/tecnicas-de-aislamiento/Agotamiento-de-asa-1>.

GUEVARA, José. et al. "Susceptibilidad a antimicrobianos de patógenos respiratorios en niños provenientes de la comunidad". *Anales de la Facultad de Medicina* [En línea]. 2004. Perú.

Vol 65. n° 1. pp. 17. [Consulta: 27 Marzo 2017]. ISSN 1025 - 5583. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/afm/v65n1/a03v65n1.pdf>.

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGÍA E HIDROLOGÍA INAMHI. "La hidrogeología del Ecuador". *Hidrogeología en Ecuador*. [En línea], 2011. (Ecuador) 1 (1), pp. 2-7 [Consulta: 19 Noviembre 2016.] Disponible en: https://issuu.com/inamhi/docs/conferencihidrogeologia_en_ecuador.

KONEMAN, Elmer, et al. *Diagnostico Microbiológico Texto y Atlas a color*. Sexta. Buenos Aires- Argentina. Panamericana, 2008. págs. 3-847, 952.

MACFADDIN, J. *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. Montevideo Uruguay. Médica Panamericana, 2000. pp 723-733.

MADIGAN, Michael, et al. *Brock Biología de los Microorganismos*. Décima. Madrid, España: Pearson, 2005. págs. 2, 636.

MOSSO, María, et, al. *Microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario Cervantes*. Madrid-España. Real Academia Nacional de Farmacia.2006, pp. 285-301.

MOSQUITO, Susan, et al. *Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en Escherichia coli asociadas a diarrea*. Lima-Perú. Salud Publica 2011. pp. 648.

NORTH CAROLINA PUBLIC HEALTH (NCPH). *Las bacterias coliformes*. [En línea] 2009. [Consulta: 26 Febrero 2017.]. Disponible en: http://epi.publichealth.nc.gov/oeo/docs/Las_Bacterias_Coliformes_WellWaterFactSt.pdf.

NTE-INEN.2169. 2013 Norma Técnica Ecuatoriana - Instituto Ecuatoriano de Normalización. *Agua. Calidad del agua. Muestreo. Manejo y conservación de muestras*.

NTE-INEN. 1105 1983. Norma Técnica Ecuatoriana-Instituto Ecuatoriano de Normalización. *Aguas. Muestreo para examen microbiológico.*

NTE-INEN. 1882. 1992. Norma Técnica Ecuatoriana-Instituto Ecuatoriano de Normalización. *Agua de mesa. Definiciones y Clasificación .*

NOM-127-SSA1. 1994. Norma Oficial Mexicana. *Salud ambiental, agua para uso y consumo humano-límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización.*

NÚÑEZ ALMEIDA, Sandra Vanessa. *Estudio microbiológico de las aguas termomineromedicinales del balneario “El Salado” de Baños de Agua Santa- Tungurahua.* [En línea] (Tesis) (Pregrado) ESPOCH. Ciencias. Bioquímica y Farmacia. Riobamba-Ecuador. 2015. pp. 15-39 [Consulta: 20 Noviembre 2016.] Disponible en: <http://dspace.espoch.edu.ec/bitstream/123456789/4399/1/56T00552%20UDCTFC.pdf>.

OCAÑA BONIFAZ, Evelyn.Patricia. *Estudio microbiológico de las aguas termomedicinales del parque acuático Los Elenes, cantón Guano, provincia Chimborazo.* [En línea] (Tesis) (Pregrado) ESPOCH. Ciencias. Bioquímica y Farmacia. Riobamba-Ecuador 2015. pp. 8-66 . [Consulta: 22 Noviembre 2016.] Disponible en: <http://dspace.espoch.edu.ec/bitstream/123456789/4420/1/56T00557%20UDCTFC.pdf>.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, E. coli. [En línea]. 2016 [Consulta: 27 Marzo 2017]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/es/>

PAMBABAY NARANJO, María Fernanda. *Estudio microbiológico de las aguas termales Reina del Rosario de Cununyacu, parroquia Pilahuintun Tungurahua.* [En línea] (Tesis) (Pregrado) ESPOCH. Ciencias. Bioquímica y Farmacia. Riobamba-Ecuador 2015. pp 3-12, 56 [Consulta: 22 Noviembre 2016.]. Disponible en: <http://http://dspace.espoch.edu.ec/bitstream/123456789/4508/1/56T00572%20UDCTFC.pdf>[bitstream/123456789/4508/1/56T00572%20UDCTFC.pdf](http://dspace.espoch.edu.ec/bitstream/123456789/4508/1/56T00572%20UDCTFC.pdf).

PETRIFILM 3M. *Guía de Interpretación 3MTM PetrifilmTM*. Microbiology Products Laboratoires 3M. 2014. Estados Unidos. pp 2-4.

PRESCOTT, Lansing; et. al. *Microbiología*. Quinta. Madrid- España : Mcgraw-Hill, 2002. pág. 9-704, 1010.

RECuento DE AEROBIOS. *Guía de Interpretación 3MTM PertrifilmTM [En línea]*. 2014. [Consulta: 22 Noviembre 2016]. Disponible en:http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat.workshopmrama/files/Petrifilm_guias.pdf.

RECuento DE COLIFORMES. *Guía de Interpretación 3MTM PertrifilmTM [En línea]*. 2014. [Consulta: 22 Noviembre 2016]. Disponible en: http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat.workshopmrama/files/Petrifilm_guias.pdf

RECuento DE MOHOS Y LEVADURAS. *Guía de Interpretación 3MTM PertrifilmTM [En línea]*. 2014. [Consulta: 22 Noviembre 2016]. Disponible en: http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat.workshopmrama/files/Petrifilm_guias.pdf.

SEIJA, V. *Género Staphylococcus*. Etiopatogenia microbiológica. 2008. pp. 257, 264.

SECRETARIA NACIONAL DE PLANIFICACIÓN Y DESARROLLO. SENPLADES. *Objetivo 7*. [En línea] 2013. [Consulta: 19 Noviembre 2016.] . Disponible en: <http://www.buenvivir.gob.ec/objetivos-nacionales-para-el-buen-vivir>.

SISTEMA DE RECuento STAPH EXPRESS. *Guía de Interpretación 3MTM PertrifilmTM [En línea]*. 2014. [Consulta: 22 Noviembre 2016]. Disponible en: http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat.workshopmrama/files/Petrifilm_guias.pdf.

TORTORA, Gerard, et al. *Introducción a la Microiología*. Novena. Buenos Aires-Argentina : Médica Panamericana, 2007. pág. 4-69.

VARELA ALONSO, Clara Teresa.. *Comparación de la resistencia al tratamiento de infecciones urinarias no complicadas a nivel internacional, con historias clínicas del servicio de urgencias del hospital San Ignacio del año 2007.* [En Línea] (Tesis)(Pregrado), Pontificia Universidad.Javeriana. Ciencias de la Salud. Bacteriología. España. 2008. pp. 45 [Consulta: 28 Marzo 2017]. Disponible en: <http://javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis189.pdf>.

ANEXOS

ANEXO A: Fuente “El Ejido”



ANEXO B: Medición In Situ de pH y temperatura



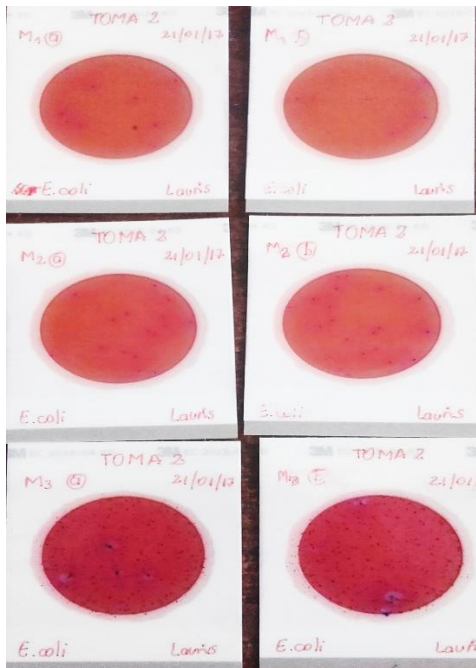
ANEXO C: Toma de muestras en el sitio A, B y C.



ANEXO D: Siembra en placas Petrifilm.



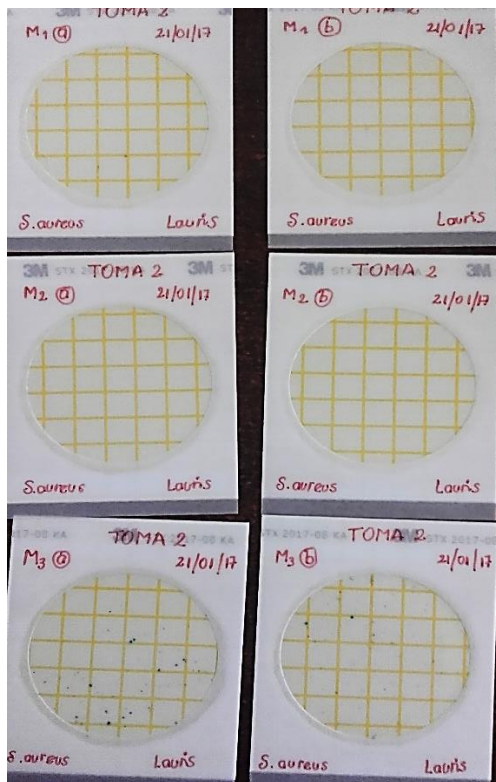
ANEXO E: Siembra en placas Petrifilm para EC.



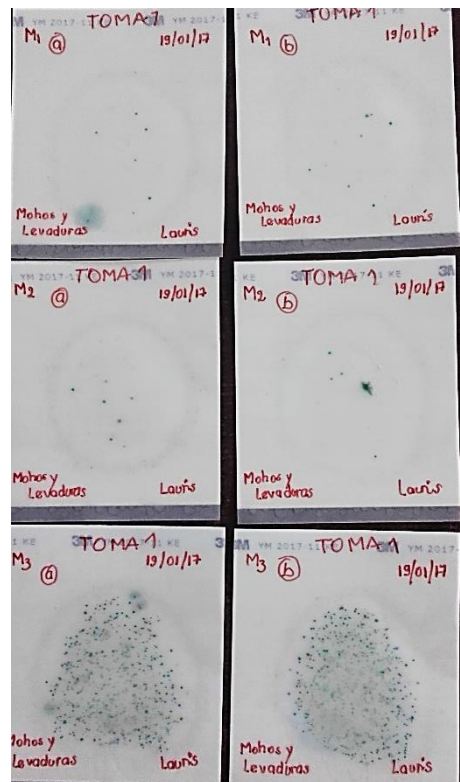
ANEXO F: Siembra en placas Petrifilm para AC.



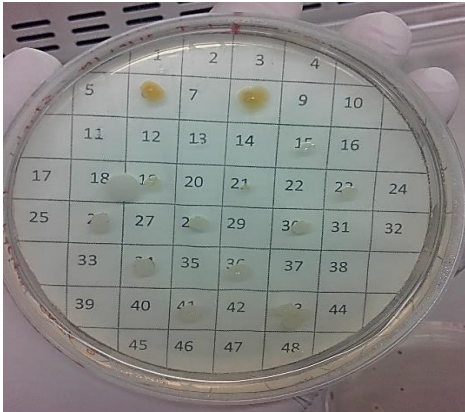
ANEXO G: Siembra en placas Petrifilm para STX.



ANEXO H: Siembra en placas Petrifilm para YM.



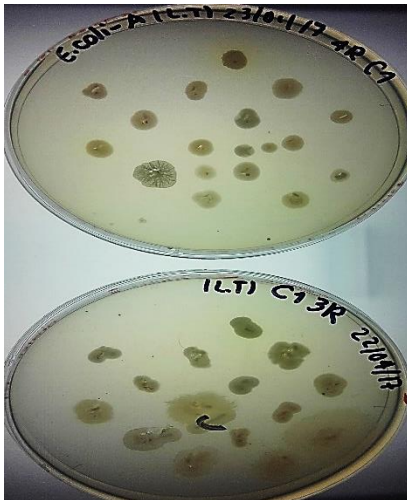
ANEXO I: Repiques de las colonias seleccionadas



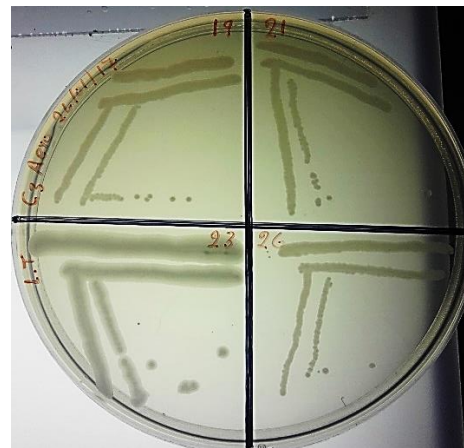
ANEXO J: Repique 1 y 2 de las colonias seleccionadas



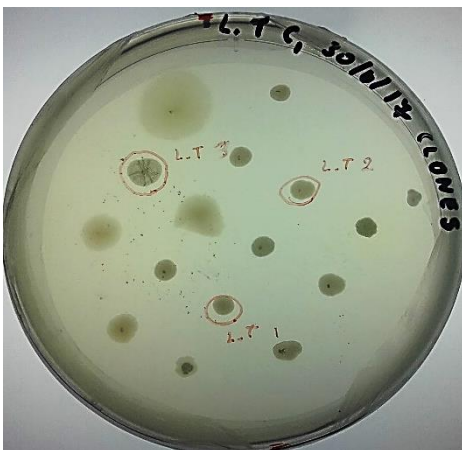
ANEXO K: Repique 3 y 4 de las colonias seleccionadas



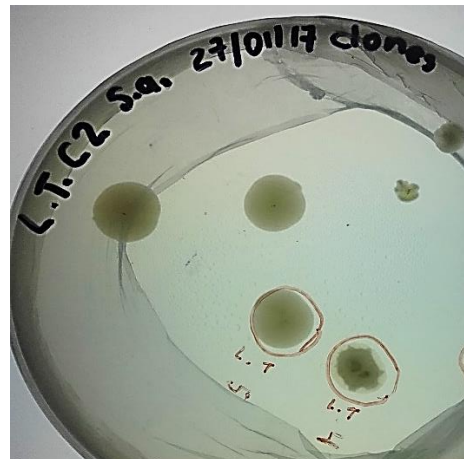
ANEXO L: Siembra por agotamiento de los clones seleccionados



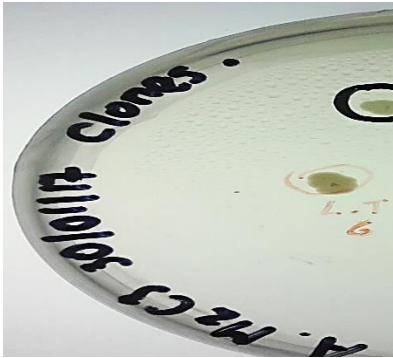
ANEXO M: Siembra y selección de los 20 clones puros (Clon 1-3)



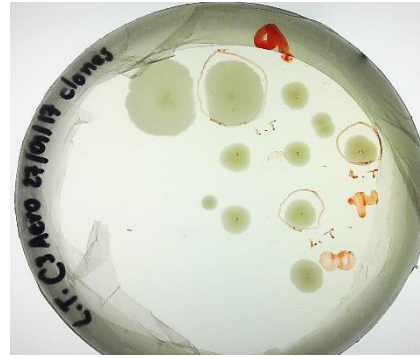
(Clon 4-5)



(Clon 6)



(Clon 7-9)



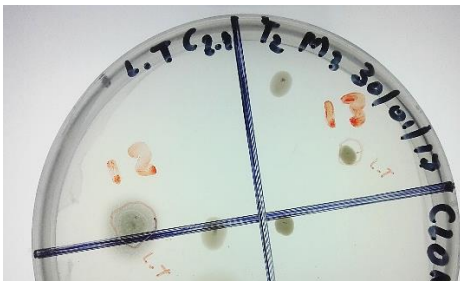
(Clon 10)



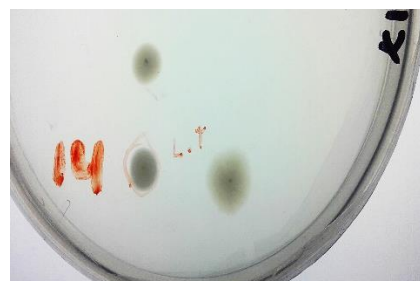
(Clon 11)



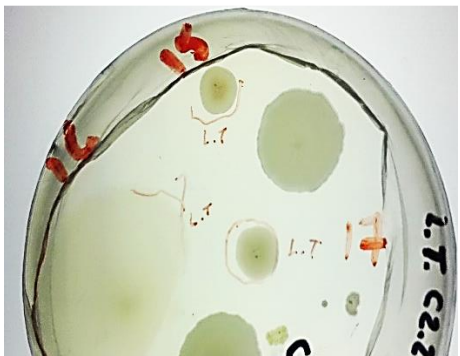
(Clon 12,13)



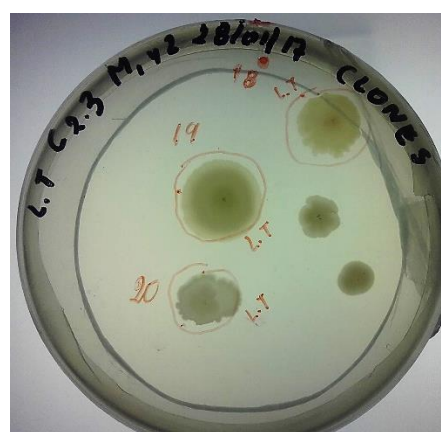
(Clon 14)



(Clon 15-17)



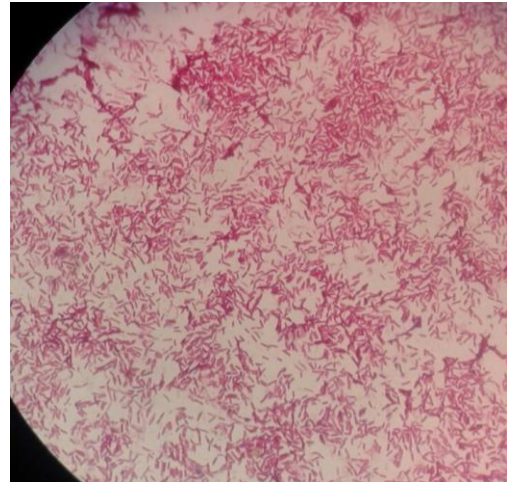
(Clon 18-20)



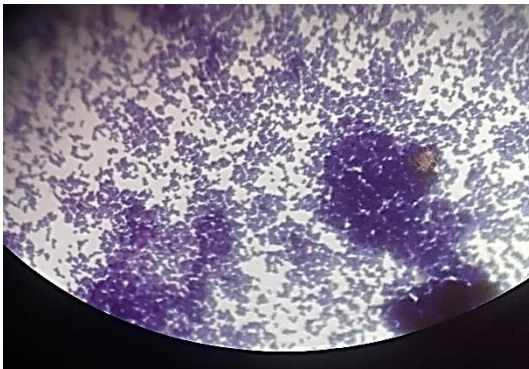
ANEXO N: Tinción Gram de los clones puros



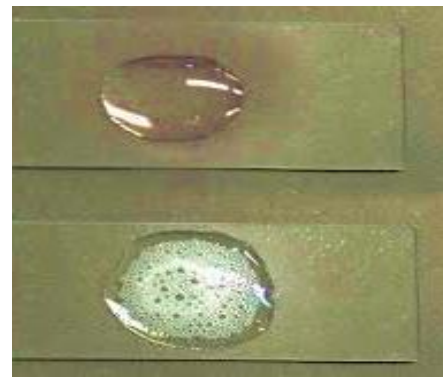
ANEXO Ñ: Bacilo Gram negativo (clon 10)



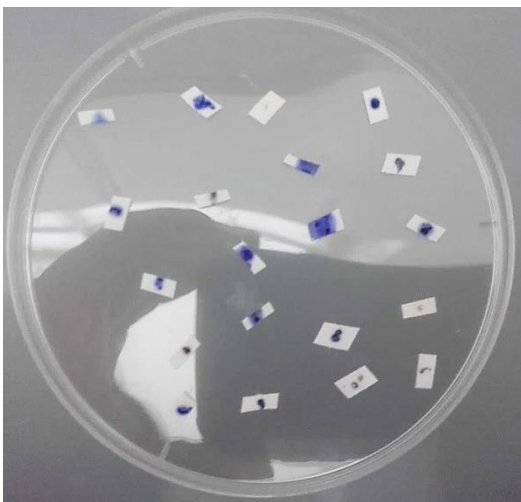
ANEXO O: Coco Gram Positivo



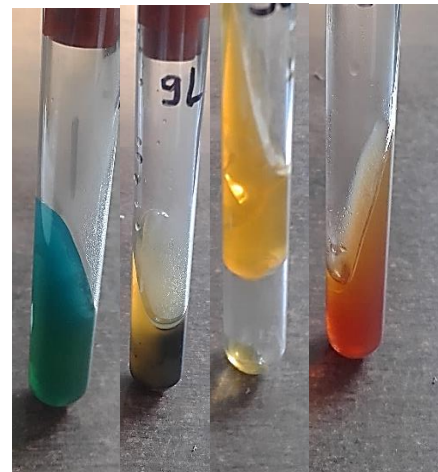
ANEXO P: Prueba de catalasa



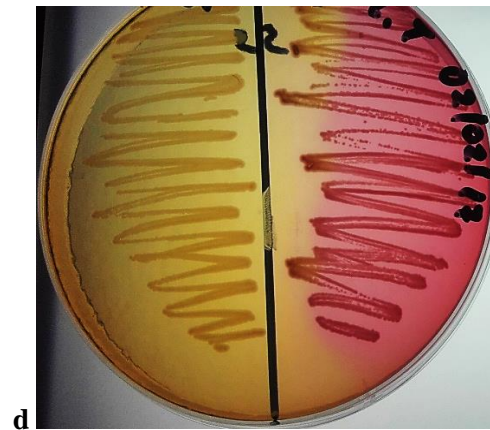
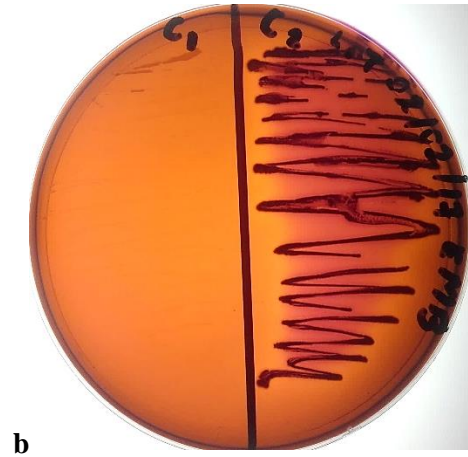
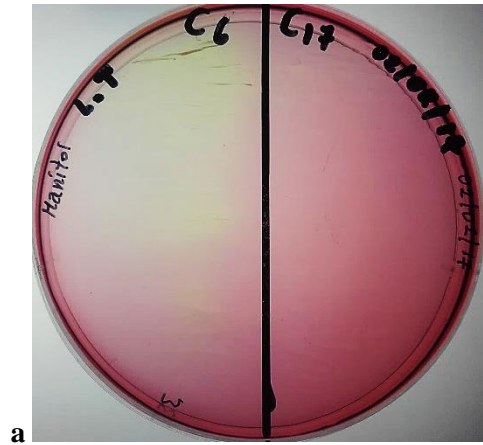
ANEXO Q: Prueba de oxidasa



ANEXO R: Pruebas Bioquímicas



ANEXO S: Pruebas confirmatorias (Manitol (a),
E.M.B (b), MacConkey (c), S-S (d).



ANEXO T: Antibiogramas

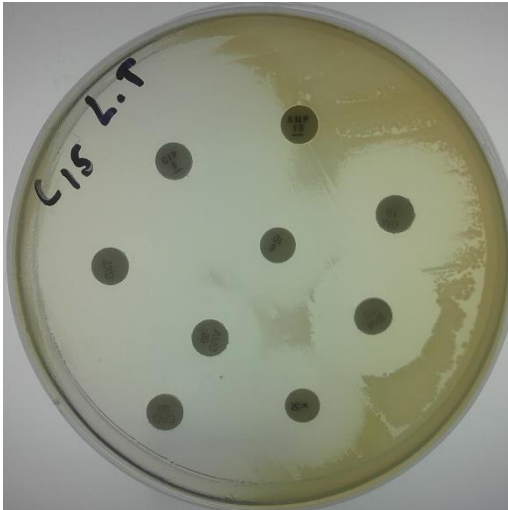
Clon 10



Clon 11



Clon 15



Clon 18

