



ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LA VERTIENTE DEL
SANTUARIO DE NUESTRA SEÑORA DE LA FUENTE DEL
CARMELO DEL BARRIO CATEQUILLA PERTENECIENTE AL
CANTÓN CHAMBO PROVINCIA DE CHIMBORAZO”**

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

BIOQUIMÍA FARMACÉUTICA

AUTORA: KATHERINE PAOLA IBARRA ARIAS

TUTOR: Dr. GERARDO EMILIO MEDINA RAMIREZ

RIOBAMBA- ECUADOR

2017

©2017, Katherine Paola Ibarra Arias

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 POLITECNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUIMICA Y FARMACIA

El tribunal del Trabajo de titulación certifica que: El trabajo de investigación “**ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LA VERTIENTE DEL SANTUARIO DE NUESTRA SEÑORA DE LA FUENTE DEL CARMELO DEL BARRIO CATEQUILLA PERTENECIENTE AL CANTÓN CHAMBO PROVINCIA DE CHIMBORAZO**” de responsabilidad de la señorita egresada Katherine Paola Ibarra Arias, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de titulación, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Dr. Gerardo Medina

DIRECTOR

.....

.....

Dra. Graciela Guerrero

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

.....

.....

Yo, Katherine Paola Ibarra Arias, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en este Trabajo de Titulación y el patrimonio intelectual del Trabajo de Titulación, pertenece a la Escuela Superior Politecnica de Chimborazo.

.....

KATHERINE PAOLA IBARRA ARIAS

AGRADECIMIENTO

En este trabajo de investigación hago llegar mi profundo agradecimiento en primer lugar a Dios por haber sido mi soporte en momentos difíciles, por darme sabiduría, paciencia y fuerzas necesarias para no rendirme y culminar mi carrera exitosamente.

A mis padres, Manuel y Mónica, mi hermano Giancarlos, a mi abuelita Vilmi, a mi papi Héctor que desde el cielo siempre me ha cuidado, a mis abuelitos Manuel y Julia, de igual manera a mis tíos Faby y Sandry, a mi primos Faby Jr., Andreito, a mis amigos Diego, Guidito gracias por el cariño y el apoyo que me han brindado a lo largo de esta etapa estudiantil y en la culminación de mi trabajo de titulación. .

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por abrirme sus puertas y brindarme la formación necesaria para ser una profesional con mística, ética y valores, de esta manera poner en práctica ante la sociedad

A los doctores Gerardo Medina y Graciela Guerrero por brindarme su amistad y su orientación y guía de conocimientos para la elaboración de este trabajo.

A mis amigas por compartir momentos inolvidables y únicos que se quedan grabados para siempre en mi corazón.

Katherine

DEDICATORIA

A Dios por ser el pilar fundamental de mi vida

A la Virgen Dolorosa por su protección, fuerza y amor

A mis padres, hermano por ser ejemplo de lucha, paciencia, apoyo y ser los motores de mi vida.

A mi madre por el ejemplo del gran ser humano lleno de amor, perseverancia, por su paciencia y por su apoyo incondicional en todo momento y por ser el motivo que me impulsa a seguir adelante.

Katherine

ÍNDICE GENERAL

| | |
|-------------------------|------|
| ÍNDICE DE TABLAS..... | xi |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | xii |
| ÍNDICE DE GRÁFICAS..... | xiii |
| RESUMEN..... | xiv |
| SUMMARY | xv |
| INTRODUCCIÓN | 1 |

CAPÍTULO I

| | |
|---|----|
| 1. MARCO TEÓRICO | 2 |
| 1.1 Antecedentes de la Investigación..... | 2 |
| 1.2 Marco conceptual o glosario..... | 2 |
| 1.2.1 El Agua..... | 2 |
| 1.2.2 Tipos de agua..... | 3 |
| 1.2.3 Calidad del agua | 4 |
| 1.2.3.1 Características Físicas..... | 4 |
| 1.2.3.2 Características Químicas | 5 |
| 1.3 Clasificación de las Aguas..... | 6 |
| 1.4 Microbiología del Agua..... | 8 |
| 1.4.1 Microbiología | 8 |
| 1.4.2 Microorganismos | 8 |
| 1.4.2.1 Identificación de Microorganismos | 8 |
| 1.4.2.2 Tipo de Microorganismos..... | 9 |
| 1.4.2.3 Indicadores Microbiológicos de la Calidad del agua..... | 9 |
| 1.5 Medios de cultivo | 10 |
| 1.5.1 Clasificación de Medios de Cultivo..... | 11 |
| 1.5.1.1 Medios de cultivo según su consistencia son: | 12 |
| 1.6 Placas petrifilm-3M | 13 |

| | | |
|-------|---|----|
| 1.7 | Tinción Gram..... | 14 |
| 1.8 | Pruebas bioquímicas | 15 |
| 1.8.1 | Prueba de la Catalasa | 15 |
| 1.8.2 | Prueba de la Oxidasa | 16 |
| 1.8.3 | Citrato | 16 |
| 1.8.4 | Reacción de la Ureasa..... | 16 |
| 1.8.5 | O.F. de Hugh & Leifson | 16 |
| 1.8.6 | Kligler Hierro Agar | 17 |
| 1.8.7 | SIM o Sulfhídrico Indol Movilidad | 17 |
| 1.9 | Antibiograma | 17 |

CAPITULO II

| | | |
|---------|--|----|
| 2. | MARCO METODOLÓGICO | 19 |
| 2.1 | Lugar de Muestreo..... | 19 |
| 2.2 | Toma de Muestra | 20 |
| 2.3. | Factores de estudio | 22 |
| 2.4. | Metodología..... | 23 |
| 2.2.1 | Características del lugar de Investigación | 23 |
| 2-5 | Materiales | 24 |
| 2.6 | Métodos | 26 |
| 2.6.1 | Muestreo | 26 |
| 2.6.1.1 | Toma de Muestra | 26 |
| 2.6.2 | Análisis Físico-Químicos | 26 |
| 2.6.3 | Análisis Microbiológico | 26 |
| 2.6.3.1 | Siembra de Microorganismos en placas..... | 26 |
| 2.6.3.2 | Placas 3M Petrifilm™ | 27 |
| 2.6.3.3 | Selección de Clones..... | 27 |
| 2.6.4 | Estabilización del Aislado Bacteriano | 27 |

| | | |
|-----------|---|----|
| 2.6.5 | Descripción Macroscópica de las Colonias | 28 |
| 2.6.6 | Tinción Gram..... | 29 |
| 2.6.7 | Preparación de Medios de Cultivo..... | 30 |
| 2.6.7.1 | Agar – Mueller Hinton, Eosina azul de Metileno, Manitol Salado, MacConkey, Salmonella-Shigella..... | 30 |
| 2.6.7.2 | Pruebas Bioquímicas: Kligler, SIM, Urea y Citrato | 30 |
| 2.6.7.3 | Identificación bacteriana de colonias aisladas | 34 |
| 2.6.7.3.1 | Método de la Prueba de Catalasa..... | 34 |
| 2.6.7.3.2 | Método de la Prueba de Oxidasa | 35 |
| 2.6.4 | Identificación de Cocos Gram positivos..... | 35 |
| 2.6.4.1 | Método de la Prueba de Na Cl 6,5%..... | 35 |
| 2.6.4.2 | Método de Siembra en Agar Manitol Salado..... | 36 |
| 2.6.5 | Identificación de Bacilos Gram Negativos | 36 |
| 2.6.5.1 | Método de siembra en Agar E.M.B..... | 36 |
| 2.6.5.2 | Método de siembra en Agar MacConkey | 37 |
| 2.6.5.3 | Método de siembra agar Salmonella Shigella..... | 38 |
| 2.6.5.4 | Método de Inoculación en el medio Hugh Leifson (O.F.)..... | 39 |
| 2.6.6 | Identificación de bacterias | 40 |

CAPITULO III

| | | |
|-------|--|----|
| 3. | RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS | 43 |
| 3.1 | Resultados de la determinación en la temperatura y el pH..... | 43 |
| 3.2 | Análisis Microbiológico | 44 |
| 3.2.1 | Análisis de bacterias Aerobias Mesófilas de la Vertiente del Santuario “Nuestra Señora de la Fuente del Carmelo” | 44 |
| 3.2.2 | Análisis de bacterias E.coli..... | 46 |
| 3.2.3 | Análisis de Mohos y Levaduras..... | 47 |
| 3.3 | Bacterias Gram Positivas y Negativas | 49 |

| | | |
|-----------------------------|---|-----------|
| 3.4 | Descripción Macroscópica de colonias aisladas de la Vertiente del Santuario de” Nuestra Señora de la Fuente del Carmelo” del Barrio Catequilla. | 51 |
| 3.5 | Pruebas realizadas para la identificación de colonias aisladas en la vertiente del Santuario de” Nuestra Señora de la Fuente del Carmelo” del Barrio Catequilla..... | 54 |
| 3.6 | . Bacterias Identificadas por pruebas bioquímicas..... | 57 |
| 3.6.1 | Análisis de las bacterias identificadas en la Vertiente del Santuario de “Nuestra Señora de la Fuente del Carmelo”. | 60 |
| 3.7 | Antibiograma | 62 |
| 3.7.1 | Análisis de Antibiogramas de Clones Bacterias Gram Negativos..... | 62 |
| CONCLUSIONES..... | | 66 |
| RECOMENDACIONES..... | | 67 |
| BIBLIOGRAFIA | | |
| ANEXOS | | |

ÍNDICE DE TABLAS

| | | |
|---------------------|--|----|
| Tabla 1-2: | Materiales de Laboratorio..... | 24 |
| Tabla 2-2: | Equipos de Laboratorio | 25 |
| Tabla 3-2: | Reactivos | 25 |
| Tabla 4-2: | Medios de Cultivo | 25 |
| Tabla 1-3: | Análisis Físico Químico del Agua..... | 43 |
| Tabla 2-3: | Recuento e bacterias Aerobias Mesófilas | 44 |
| Tabla 3-3: | Recuento de Bacterias del género Staphylococcus de la Vertiente del Santuario “Nuestra Señora de la Fuente del Carmelo” | 46 |
| Tabla 4-3: | Recuento de del Mohos y Levaduras de la Vertiente del Santuario de” Nuestra Señora de la Fuente del Carmelo”..... | 47 |
| Tabla 5-3: | Recuento de bacterias Gram Positivas y Negativas..... | 49 |
| Tabla 6-3: | Descripción Macroscópica de las colonias | 51 |
| Tabla 7-3: | Pruebas Bioquímicas | 54 |
| Tabla 8-3: | Bacterias Inidentificadas Cocos Gram Positivos | 57 |
| Tabla 9-3: | Bacterias Inidentificadas Bacilos Gram Negativos | 59 |
| Tabla 10-3: | Análisis de las bacterias identificadas en la Vertiente del Santuario de “Nuestra Señora de la Fuente del Carmelo”..... | 60 |
| Tabla 11-3: | Antibiograma de los Clones Bacterias Gram Negativos de la vertiente del Santuario de “Nuestra Señora de la Fuente del Carmelo”. | 62 |
| Tabla 12--3: | Antibiograma de los Clones Cocos Gram Positivos de la vertiente del Santuario de “Nuestra Señora de la Fuente del Carmelo”. | 64 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | | |
|---------------------|---|----|
| FIGURA 1-2: | Vertiente de “Nuestra Señora del Santuario” | 19 |
| FIGURA 2-2: | Tanque de Captación | 20 |
| FIGURA 3-2: | Fuente de bebida | 21 |
| FIGURA 4-2: | Vivienda del Sector..... | 21 |
| FIGURA 5-2: | Tanque de Cloración..... | 22 |
| FIGURA 6-2: | Esquema del proceso de Análisis Microbiológico..... | 23 |
| FIGURA 7-2: | Cepas Puras..... | 28 |
| FIGURA 8-2: | Caracteres de una colonia en medio sólido..... | 29 |
| FIGURA 9-2: | Prueba Bioquímica Agar Kliguer..... | 31 |
| FIGURA 10-2: | Prueba –Urea..... | 32 |
| FIGURA 11-2: | Prueba Citrato | 33 |
| FIGURA 12-2: | Prueba SIM | 34 |
| FIGURA 13-2: | Prueba –Catalasa..... | 35 |
| FIGURA 14-2: | Prueba –E.M.B..... | 37 |
| FIGURA 15-2: | PRUEBA MAC-CONKEY | 38 |
| FIGURA 16-2: | Prueba O.F. | 39 |
| FIGURA 17-2: | Esquema de la identificación de los microorganismos | 40 |
| FIGURA 18-2: | Antibiograma | 41 |

ÍNDICE DE GRÁFICAS

| | |
|--|----|
| GRÁFICA 1-3: Recuento Aerobias Mesófilas de la Vertiente del Santuario de” Nuestra Señora de la Fuente del Carmelo” | 45 |
| GRÁFICA 3-3: Recuento de Bacterias del género Staphylococcus de la Vertiente del Santuario de” Nuestra Señora de la Fuente del Carmelo” | 47 |
| GRÁFICA 4-3: Recuento de Mohos y Levaduras de la Vertiente del Santuario de “Nuestra Señora de la Fuente del Carmelo” del Barrio Catequilla. | 49 |
| GRÁFICA 5-3: Porcentaje de Cocos Gram Positivos y Bacterias Gram Negativos | 50 |
| GRÁFICA 6-3: Bacterias Identificadas Cocos Gram positivos..... | 58 |
| GRÁFICA 7-3: Bacterias Identificadas Bacterias Gram Negativos | 60 |
| GRÁFICA 8-3: Bacterias Identificadas | 61 |

RESUMEN

El objetivo fue el análisis microbiológico de la vertiente del Santuario de Nuestra Señora de la fuente del Carmelo del barrio Catequilla perteneciente al cantón Chambo provincia de Chimborazo, el desarrollo de la investigación se llevó a cabo en los laboratorios de análisis clínicos y microbiológicos de la facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, en el que se realizaron diferentes pruebas para la cuantificación e identificación de bacterias aerobias mesofilas, *E. coli/Coliformes*, *Staphylococcus*, mohos y levaduras. La cuantificación de microorganismos se desarrolló utilizando el método de placas Petrifilm, las colonias fueron aisladas por medio de repiques en agar Muller-Hinton, posteriormente se realizó el análisis y descripción macroscópica, tinción Gram, pruebas bioquímicas, oxidasa, catalasa, antibiograma, incluyendo pruebas confirmatorias para bacterias Gram positivas y negativas a cada una de las colonias aisladas. Se aislaron y a su vez se identificaron 21 cepas bacterianas las mismas que corresponden a los tipos morfológicos de Cocos Gram positivos (62%), Bacilos Gram negativos (38%), esto indica que en el agua de la vertiente existe prevalencia de Cocos Gram positivos. Las especies encontradas fueron *Staphylococcus epidermidis* (38%), *Pseudomonas aeruginosa* (33%), *Staphylococcus aureus* (29%), notándose la presencia de bacterias autóctonas, y otras que se encuentran en el suelo y aguas provenientes de otros sitios. Sobre los 21 clones identificados se realizó el antibiograma por el método de difusión en agar observándose que la mayoría de los aislados bacterianos fueron resistentes a los antibióticos utilizados. Se recomienda que la Municipalidad del Cantón Chambo en conjunto con el laboratorio de análisis de agua siga llevando a cabo el mantenimiento y seguimiento de tuberías para tener una agua de buena calidad.

PALABRAS CLAVE: <BIOQUÍMICA>, <MICROBIOLOGÍA>, <ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO>, <VERTIENTE DE AGUA NATURAL>, <MICROORGANISMOS>, <CALIDAD DEL AGUA>, <PLACAS PETRIFILM>, <CHAMBO (CANTÓN)>.

SUMMARY

The objective consisted of a microbiological analysis of the spring of the Santuario de Nuestra Señora de la Fuente del Carmelo, of the Catequilla neighborhood, belonging to the Chambo canton, Chimborazo province. The investigation development was carried out in the clinic analysis and microbiological labs of the Science Faculty of the Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, in which the different tests were carried out for the quantification and identification of the mesophyll aerobic bacteria *E.coli/Coliforms*, *Staphylococcus*, molds and yeasts. The quantification of the microorganisms was developed using the Petrifilm plate method; the colonies were isolated through mincing in Mueller-Hinton agar; later, the analysis and macroscopic description, Gram dyeing, biochemical testing, oxidase, catalase, antibiogram were carried out, including confirmatory testing for positive and negative Gram bacteria to each isolated colony; 21 bacteria strains were isolated and identified which correspond to the morphological types of Gram positive Cocci (62%) and Gram negative Bacilli (38%) : This shows that in the spring water there is a prevalence of the Gram positive Cocci. The found species were *Staphylococcus aureus* (29%), noting the presence of native bacteria and other found in the soil and water from other sites. On the 21 identified clones the antibiogram was carried out by the diffusion in agar method, observing that most of the isolated bacteria were resistant to the used antibiotics. The Chambo Canton Municipality, together with the water analysis lab, is recommended to carry out maintenance and follow up of the piping so as to avoid possible contamination which can be produced by this factor.

Key Words: <BIOCHEMISTRY>, <MICROBIOLOGY>, <MICROBIOLOGICAL ANALYSIS>, <NATURAL WATER SPRING>, <MICROORGANISMS>, <WATER QUALITY>, <PETRI FILM PLATES>, <CHAMBO(CANTON) >.

INTRODUCCIÓN

El Ecuador es un país con una gran variedad de recursos naturales, siendo uno de los principales las aguas subterráneas. El aspecto importante es controlar la calidad microbiológica para evidenciar la pureza bacteriológica, condición obligatoria que debe cumplir el agua para garantizar la salud de la población que hace uso de las mismas.

Las aguas subterráneas son el agua situada por debajo de la superficie del suelo en los espacios porosos del suelo y en las fracturas de las formaciones rocosas. La profundidad a la que los espacios de los poros del suelo o las fracturas y los vacíos en la roca a ser completamente saturados de agua se llama Capa freática. El agua subterránea fluye hacia la superficie natural, la descarga natural a menudo se filtra, y se pueden formar los oasis o los humedales. Las aguas subterráneas también son a menudo extraídas para usos agrícolas, municipales e industriales mediante la construcción y operación de pozos de extracción.

La medición de los niveles del agua subterránea, así como el control de su calidad, se inició en los años setenta en muchos acuíferos por el Instituto Geológico y Minero de España (IGME).

Existe gran cantidad de fuentes de aguas naturales, dentro de las cuales se escogió la Vertiente del Santuario de Nuestra Señora de la Fuente del Carmelo, la cual es conocida por su historia siendo frecuentada por devotos y habitantes quienes utilizan esta agua como milagrosa por sus creencias religiosas y además para uso doméstico y personal.

Por tal motivo el objetivo de esta investigación fue realizar el análisis microbiológico correspondiente a la vertiente Nuestra Señora de la Fuente del Carmelo, para determinar la calidad del agua evaluando la presencia de microorganismos como coliformes totales y fecales/*E.coli*, aerobios mesófilos, mohos y levaduras, *Staphylococcus*, de tal manera que se dé a conocer las condiciones en las que se encuentra para poder garantizar el bienestar y prevenir la transmisión de enfermedades en los habitantes contemplado en el plan del buen vivir enmarcado en la constitución de la República del Ecuador.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes de Investigación

En la antigüedad los pueblos andinos consideraban al agua como un ser vivo reconocido dentro de las culturas como el origen y fuente de la vida. En el tiempo de los incas el agua fue considerada como un recurso natural proveniente del Dios creador del universo Wiracocha, que fecunda la Pachamama, elemento indispensable de la vida.(COMUNIDAD ANDINA, 2010, p.12)

El estudio de los microorganismos concurrentes en el agua data desde hace muchos años atrás, poniendo énfasis principalmente en el estudio de las bacterias patógenas presentes, a fin de inspeccionar las enfermedades transmitidas por este medio. (COMUNIDAD ANDINA, 2010, p.12)

Actualmente estudios ecológicos acerca de la microbiota de manantiales han transformado la perspectiva de la biodiversidad microbiana, su composición y por ello con esta investigación se pretende dar a conocer la variedad de microorganismos que habitan en las aguas.

1.2 Marco conceptual o glosario

1.2.1 *El Agua*

El agua es uno de los componentes más abundantes en la superficie terrestre y es considerada como recurso natural que junto con el aire, tierra y energía constituyen los cuatro recursos que ayudan al desarrollo de la vida. (Félez Santafé M 1987,p.13)

Según la OMS la conservación de la calidad del agua dulce es importante para el suministro de agua de bebida , producción de alimentos y uso recreativo . (Félez Santafé M 1987,p.13)

El volumen del agua en los seres humanos depende de la edad y actúa como regulador de la temperatura corporal siendo un nutriente esencial para la vida; junto a los demás líquidos que

ingerimos hace posible todas las reacciones químicas celulares, el transporte de nutrientes, células, hormonas, enzimas, y proteínas.(Carbajal Azcona A y Gonzales Fernandez M ,2013:p.65)

El derecho humano al agua es fundamental e irrenunciable, debido a que constituye patrimonio nacional estratégico de uso público, imprescriptible y esencial para la vida (Constitución Política del Ecuador, Artículo 12,2008), por lo tanto, el estado ecuatoriano como autoridad única está en la obligación de garantizar y respetar este derecho.

1.2.2 Tipos de Aguas Naturales

Según la Norma Cubana de Agua Potable (N.C. 93-02:1985) establece normas y códigos que definen diferentes tipos de aguas naturales sus respectivas características ,según se utlicen para fines balneológicos ,abasto publico o como agua de consumo. En dichas normas aparecen las siguientes definiciones:

Agua potable: Es utilizada como suministro público y también apta para uso doméstico, libre de cuerpos extraños que sean peligrosos para la salud; presentándose con un sabor agradable, incolora y transparente. (Fagundo, Cima y González ,2000: p.2)

Agua mineral natural: Aquélla bacteriológicamente sana originada en un estrato o yacimiento subterráneo y que broten de un manantial en uno o varios puntos de afloramiento, naturales que garantizan la pureza microbiológica. Pueden distinguirse claramente de las restantes aguas potables por su contenido de sales minerales constituyentes que aportan al metabolismo humano. (Fagundo, Cima y González ,2000: p.2)

Agua mineral medicinal: Es utilizada con fin terapéutico, posee propiedades curativas. (Fagundo, Cima y González ,2000: p.3)

Aguas termales: Son aguas con una elevada cantidad de minerales que brotan del suelo de manera natural y a una temperatura que supera en 5°C la temperatura registrada en la superficie,

originados en los estratos subterráneos del planeta y por eso son cálidas. La mineralización del agua y su temperatura hacen que las aguas termales sean consideradas terapéuticas, poseen factores energéticos como la potente ionización, mineralización, radiactividad, gases y variaciones de pH. (Fagundo, Cima y González ,2000: p.3)

Aguas de Manantial: Son aguas de origen subterráneo que emergen espontáneamente en la superficie de la tierra, con características naturales de pureza que permiten su consumo, previa aplicación de los mínimos tratamientos físicos requeridos para la separación de los elementos materiales. (Fagundo, Cima y González ,2000: p.3)

1.2.3 Calidad del agua

La calidad del agua se refiere a concentraciones, especificaciones y aspectos físicos de sustancias orgánicas e inorgánicas, básicamente a las condiciones en las que se encuentra la misma con respecto a sus características físicas, químicas y microbiológicas en su estado natural o después de ser modificadas por el accionar humano, la calidad presenta variaciones debido a factores externos e internos. (Sierra,2011c: p 47). Se considera que el agua es de buena calidad cuando no ocasiona daño; además debe estar libre de sustancias y microorganismos peligrosos para los consumidores y que transmitan sensaciones desagradables.

1.2.3.1 Características Físicas

Las características físicas son aquellas que se pueden determinar mediante los sentidos como vista, olfato para lograr aceptabilidad del agua. (Barrenechea 2004,p.4)

- **Turbidez:** Mide el nivel de transmitancia de luz y sirve como una medida de la calidad del agua en relación a materia suspendida coloidal y residual. La turbidez varía de acuerdo a la fuente de luz y el método de medición de las propiedades de absorción de luz del material suspendido. (Severiche et al.,2015:p 11)

- **Sólidos Totales Disueltos:** Es la medida de concentración total de sales inorgánicas en el agua e indica la presencia de salinidad. Los sólidos totales disueltos y la conductividad eléctrica están estrechamente relacionados, cuanto mayor sea la cantidad de sales disueltas en el agua, mayor será el valor de la conductividad eléctrica. (Morales y Moscoso, 2015, p. 33)
- **Color:** Se origina por la descomposición natural de la materia vegetal de las plantas y por la disolución de ciertos minerales presentes en el subsuelo. El color está clasificado como color aparente y verdadero. (Barrenechea 2004 , p.8)
- **Temperatura:** Este parámetro es muy importante dentro del análisis del agua debido a que interviene en el retardo o aceleración de la actividad biológica, la absorción de oxígeno, la precipitación de compuestos, la formación de depósitos y la desinfección. (Barrenechea 2004 , p.12)
- **pH:** Es un indicador de la acidez y alcalinidad de una disolución. El pH menor de 7.0 indica tendencia hacia la acidez, mientras que un valor mayor de 7.0 indica que es alcalino. La mayoría de las aguas naturales tienen un pH entre 4 y 9, aunque varias de ellas tienen un pH ligeramente básico debido a la presencia de carbonatos y bicarbonatos. (Severiche et al., 2015a: p. 11)

1.2.3.2 Características Químicas

La calidad química está determinada por las sustancias presentes en las aguas.

- **Alcalinidad:** Se define como la capacidad del agua para neutralizar ácidos o aceptar protones, desempeñando un rol principal en la productividad de cuerpos de aguas naturales, sirviendo como una fuente de reserva para la fotosíntesis. (Severiche et al., 2015 , p.16).
- **Dureza:** Es la concentración de compuestos minerales que hay en una determinada cantidad de agua, como sales de calcio, magnesio y hierro siendo directamente proporcional a la concentración de sales alcalinas. (Barrenechea 2004 , p.29)

- **Materia Orgánica:** La materia orgánica disuelta es una compleja mezcla heterogénea de macro-moléculas, cuyos principales componentes en las aguas dulces son sustancias húmicas, carbohidratos y aminoácidos. La MOD en las aguas naturales puede ser originada por la descomposición del material biológico procedente de animales, plantas y microorganismos (Spence *et al.* 2011).
- **Metales Pesados:** Los metales pesados son un grupo de elementos químicos que presentan una densidad alta. Son en general tóxicos para los seres humanos y entre los más susceptibles de presentarse en el agua destacamos mercurio, níquel, cobre, plomo y cromo (Breu F *et al.*, 2008 : p.12)

1.3 Clasificación de las Aguas

Las aguas son conocidas como recursos naturales debido a que poseen minerales diferenciándose del agua de consumo pudiendo ser clasificadas de acuerdo a diversos parámetros, como se muestra a continuación en: (Armijo y San Martín, 1994)

- **De acuerdo a sus usos:** Agua mineral medicinal, mineral. (Fagundo, Cima y González, 1996 :p .4)
 - ✓ **Aguas minerales:** Poseen prácticamente invariable su caudal, temperatura, composición química y bacteriológica.
 - ✓ **Agua mineromedicinal:** Son aquellas aguas que por su composición y características propias pueden ser utilizadas con fines terapéuticos.
- **De acuerdo a su origen:** Superficiales y subterráneas. (Fagundo *et al.*, 1996 :p. 5)
 - ✓ **Superficiales:** Son aquellas que se encuentran sobre la superficie del suelo, se produce por el afloramiento de aguas subterráneas.
 - ✓ **Subterráneas:** El agua subterránea representa una fracción importante de la masa de agua presente en los continentes. Esta se aloja en los acuíferos bajo la superficie de la Tierra.

- **De acuerdo a su temperatura:** La temperatura es la principal característica del agua, para su determinación se verifica el origen de su nacimiento, la temperatura a la que emergió la fuente. Según Schoeller (1962), para clasificar las aguas en dependencia de su temperatura considera la temperatura anual del aire o la temperatura del suelo en que emerge el manantial. Obteniéndose la siguiente clasificación. (Inamhi, 2014)
 - ✓ Frías : < 20 °C
 - ✓ Hipo termales : Entre 20°C y 30° C
 - ✓ Termales: Entre 30°C y 40°C
 - ✓ Hipertermales: > 40°C
- **De acuerdo a su pH:** Es uno de los análisis más comunes en el suelo y análisis del agua, es la medida estándar de la acidez o alcalinidad de una solución. (BURBANO, et al. 2013)
 - ✓ Ácidas : El pH es menor de 6.8
 - ✓ Neutra : Se encuentra en un rango de 6.8 a 7.2
 - ✓ Alcalina : Es superior a 7.2
- **De acuerdo a sus iones predominantes:** Es una de las clasificaciones más usada para identificar modelos de aguas. (Fagundo et al., 1996 :p. 16)

Según su relación con los aniones:

- Bicarbonatadas
- Sulfatadas
- Cloruradas
- Bicarbonatadas-sulfatadas
- Bicarbonatadas- cloruradas
- Sulfatadas – cloruradas

Según su relación con los cationes:

- Cálcidas
- Magnésicas
- Sódicas (Fagundo et al., 1996 : p. 17)

1.4 Microbiología del Agua

El análisis microbiológico del agua se centra en los microorganismos patógenos como son bacterias, virus y protozoos que son los causantes de producir ciertas enfermedades en los seres humanos.(Apella y Araujo , 2005 : p .1)

1.4.1 Microbiología

La microbiología es la rama de la biología que se encarga del estudio de los microorganismos, seres vivos pequeños; esto concierne a su forma, estructura, fisiología, reproducción, metabolismo e identificación. El objetivo de la Microbiología es comprender las actividades perjudiciales y beneficiosas de los microorganismos para diseñar la manera de aumentar los beneficios y reducir o eliminar los daños.(Apella y Araujo , 2005 : p .2)

1.4.2 Microorganismos

Los microorganismos son organismos vivos que no se distinguen a simple vista. Los microorganismos se agrupan en dos categorías, la primera procariotas en la cual se encuentran las archaeas y las bacterias, mientras que en la segunda, las eucariotas se encuentran hongos, algas y protozoarios. También se considera como microorganismos a los virus, viroides y priones. La diversidad microbiana depende de la variedad estructural y funcional que presenten los así como su morfología, división celular, variaciones en el tamaño celular o bien en la capacidad metabólica y de adaptación. (MONTAÑO, M. et al., 2010)

1.4.2.1 Identificación de Microorganismos

Existen cepas de bacterias que han sido seleccionadas por sus características morfológicas, tinción Gram, fisiológicas , bioquímicas, pruebas de catalasa, oxidasa, hidrólisis de gelatina y almidón, ureasa y reducción de nitratos.(Carmen et al., 2004 : p.8)

1.4.2.2 Tipo de Microorganismos

- **Microorganismos Autóctonos:** Son microorganismos propios de un determinado ecosistema y se encuentra siempre en él; por ejemplo las bacteria *Pseudomona Aureoginosa* que son propias del suelo. (Carmen et al., 2004 : p.12)
- **Microorganismos Alóctonos:** Son los que acceden a un hábitat extraño al ecosistema y se presentan únicamente de forma transitoria, por ejemplo la *E.coli* que es transmitida al agua mediante las excretas de animales y seres humanos. (Carmen et al., 2004 : p.14)

1.4.2.3 Indicadores Microbiológicos de la Calidad del agua

Los microorganismos indicadores, nos permiten establecer las condiciones de calidad sanitaria incluyendo las buenas prácticas de manufactura, mantenimiento y tratamiento de las redes de distribución para verificar el estado del agua. Cuando se comprueba la presencia de grupos indicadores se puede deducir que los microorganismos patógenos están presentes en la misma cantidad y mantienen un comportamiento similar a la del indicador frente a factores tales como temperatura, pH. (Arcos Pulido et al., 2005:p.1)

Los indicadores microbiológicos son:

- **Coliformes:** El grupo de bacterias coliformes es el principal indicador de la calidad del agua, que sirve para dar respuesta sobre la existencia o no de contaminaciones. Habitan usualmente en el intestino de los mamíferos, se caracterizar por pertenecer a la familia de las *Enterobacteriaceae*, dentro de estas se encuentran los géneros: *Escherichia*, *Klebsellia*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter* y *Edwardsiella*. Los coliformes se presentan como bastones Gram negativos. (Arcos Pulido et al., 2005:p.8)
- **Aerobios Mesófilos:** Son microorganismos heterótrofos, que descomponen la materia orgánica a temperaturas que oscilan entre 30 y 40°. Son capaces de crecer en agar nutritivo, se investiga por el método de recuento en placa. Se desarrollan en presencia de oxígeno a una temperatura de incubación de 37°C durante un periodo de 24 horas. (Arcos Pulido et al., 2005:p.12)

- ***Staphylococcus aureus***: Es una bacteria anaerobia formada por Cocos Gram positivos, no esporuladas y se desarrollan a una temperatura de incubación de 37°C durante un periodo de 24 horas. Puede causar infecciones en el ser humano y animales. (Orlando et al., 2011:p.30)

- **Mohos y Levaduras:**

Mohos: Pueden encontrarse al aire libre y en interiores. Su crecimiento es mejor en condiciones cálidas y húmedas propagándose mediante esporas. Las esporas del moho pueden sobrevivir en condiciones ambientales; su temperatura de incubación es de 25°C durante un periodo de 3 a 5 días. (Orlando et al., 2011:p.30)

Levaduras: Son organismos heterotróficos debido a que pueden alimentarse de materia preformada. Las levaduras forman en el medio de cultivo colonias pastosas, constituidas por células esféricas, ovoideas, alargadas o elipsoidales. Su tamaño puede ir de 1 a 9 µm de ancho y 2 a más de 20 µm de longitud según la especie, nutrición, edad y otros factores, se desarrollan a una temperatura de 25 °C durante un periodo de 3 a 5 días. (PFALLER, M. et al., 2007p. 2)

1.5 Medios de cultivo

Un medio de cultivo es un conjunto de nutrientes, factores de crecimiento y otros componentes que crean las condiciones necesarias para el desarrollo de los microorganismos. Para que las bacterias crezcan el medio debe tener una temperatura, presión de oxígeno, grado de humedad adecuada.

Para la preparación del medio de cultivo se pesa la cantidad deseada y se disuelve en agua destilada, Si el medio contiene un agente solidificante (agar) hay que calentar hasta la ebullición del mismo agitando de vez en cuando, para asegurar una completa disolución del agar, se coloca en el autoclave para su esterilización, el medio se deja enfriar a temperatura ambiente y se coloca en cajas Petri o tubos de ensayo estériles. (Ortega et al., 2009: p.1)

1.5.1 Clasificación de Medios de Cultivo

El desarrollo de los microorganismos se realiza en medios de cultivo: que son ambientes artificiales que proporcionan sustancias necesarias para el desarrollo microbiano. Los medios de cultivo se clasifican en:

Medios Generales: Este tipo de medios de cultivo permite el crecimiento de varios microorganismos. (Ortega et al., 2009: p.3)

Medios de Enriquecimiento: Favorece el crecimiento de un determinado tipo de microorganismo sin inhibir el crecimiento de los demás. Se adicionan al medio de cultivo sustancias nutritivas tales como azúcares, sangre, suero, extractos de tejidos de animales y plantas. (Ortega et al., 2009: p.3)

Medio Selectivo: Permite el crecimiento de un determinado tipo de microorganismo llegando a inhibir el crecimiento de los demás. Estos medios son de gran utilidad para el aislamiento de microorganismos a partir de poblaciones microbianas mixtas. Se incorporan ciertas sustancias que otorgan la selectividad buscada al medio, por ejemplo lactosa, bilis, NaCl, antibióticos. (Ortega et al., 2009: p.4)

Medios diferenciales : Este medio de cultivo permite que se pueda diferenciar dos o más tipos de bacterias teniendo en cuenta el comportamiento que presente frente algún nutriente del medio y poniendo de manifiesto propiedades que algún tipo de microorganismo posea. (Ortega et al., 2009: p.4)

Medios de Identificación: Son aquellos medios que permiten comprobar cualidades para la identificación de los microorganismos. Por ejemplo el Agar Kliguer, el medio de Simmons y en general, cualquier medio al que se haya añadido un elemento diferencial, son medios utilizados para la identificación (Ortega et al., 2009: p.4)

1.5.1.1 Medios de cultivo según su consistencia son:

Líquidos: Son los que se presentan en este estado, denominándose caldos. El medio líquido más utilizado es el llamado caldo nutritivo, compuesto principalmente de extracto de carne, peptona y agua, se utiliza fundamentalmente cuando se pretende la obtención de una suspensión bacteriana de una determinada concentración..(López Tévez et al., 2010: p.1)

Sólidos: Este medio de cultivo se utiliza para obtener bacterias aisladas durante la formación de colonias sobre la superficie del medio de cultivo permitiendo el estudio de la morfología de las colonias. Se preparan a partir de los medios líquidos, agregándoles un agente gelificante como agar la cual brinda consistencia y solidez al medio. (López Tévez et al., 2010: p.1)

Semisólidos: Se preparan a partir de los medios líquidos, agregando a éstos un agente solidificante en una proporción menor que para preparar medios sólidos. Uno de sus usos es la investigación de la movilidad de las bacterias. (López Tévez et al., 2010: p.1)

1.4.3. Principales Medios de Cultivo

Agar EMB: Es más conocido como agar con eosina y azul de metileno. Se emplea como medio de diferenciación para el cultivo de flora Gram negativa permitiendo que la lactosa que tiene en su composición diferencie a los microorganismos fermentadores de azúcar, mientras que la eosina y el azul de metileno inhiben la mayoría de bacterias Gram positivas .(Orlando et al., 2011: p.27)

Agar Mueller Hinton: Es un medio enriquecido no selectivo que favorece el desarrollo de microorganismos. Se utiliza para pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos, para la realización de antibiogramas por su buena productibilidad los patógenos crecen favoreciendo el crecimiento de cualquier tipo de células bacterianas. (Orlando et al., 2011: p.27)

Agar MacConkey: Es un medio de cultivo selectivo y diferencial que permite el crecimiento de las enterobacterias, inhibiendo el desarrollo de bacterias Gram positivas. Se debe tener en

cuenta que las bacterias que fermentan lactosa llegan a formar colonias de coloración roja, mientras que las bacterias que no fermentan no presentan coloración. (Prats , 2006 ,p.3)

Agar Manitol Salado: Es un medio de cultivo selectivo y diferencial, usado para aislar *Staphylococcus* . El cloruro de sodio constituye el agente selectivo que inhibe el desarrollo de la flora acompañante. Los estafilococos son capaces de fermentar manitol llegando a producir colonias de coloración amarilla; mientras que los estafilococos no patógenos no llegan a fermentar y tienen una coloración rosa. (Prats , 2006 , p.4)

Agar Salmonella Shigella: Es un medio selectivo y diferencial que ayuda al aislamiento de bacilos entéricos patógenos pertenecientes al género *Salmonella*. Se considera un medio selectivo porque presenta una inhibición hacia los microorganismos Gram positivos y Enterobacterias diferentes de *Salmonella* y *Shigella* ya que las sales biliares, verde brillante y citratos permiten esta inhibición. Se basa en la fermentación de la lactosa; es positiva toma una coloración rojiza mientras que si no existe fermentación estas son transparentes en el caso de shigella y en salmonella se diferencia por su centro negro. (Prats , 2006 , p.6)

1.6 Placas petrifilm-3M

Las placas petrifilm son un soporte físico donde se coloca un medio de cultivo deshidratado que contiene agentes gelificante que son solubles en agua fría, ayudando a la determinación y conteo rápido de microorganismos. (Petrifilm, 2000, p.1). El análisis microbiológico se lo realiza de la siguiente manera:

- Inocular: Se levanta la película superior y se agrega la muestra
- Incubar la placa a 35 °C durante 24 horas
- Realizar el contaje de las colonias que se encuentran en la placa (Petrifilm, 2000, p.1)

Las placas utilizadas para el recuento son las siguientes:

Petrifilm *E. coli*/ coliformes: Su indicador rojo violeta y bilis actúan como nutrientes, permitiendo el conteo de sus colonias de manera fácil. Aproximadamente el 95% de las colonias

E. coli producen gas tomando una coloración azul y rojos azules, el gas que es producido alrededor de las colonias confirman la presencia de lactosa. (3M Microbiology ,2003, p.2)

Placas Petrifilm Recuento Staph Express: Contiene un sistema de medio de cultivo preparado de Baird-Parker que es selectivo y diferencial para el recuento de *Staphylococcus aureus*, permitiendo obtener resultados en menor tiempo. Las colonias presentan color rojo violáceo para facilitar la interpretación. (3M Microbiology ,2003, p.6)

Placas Petrifilm Recuento de Aerobios: Este medio de cultivo contiene nutriente del agar Standars Methods, es un agente gelificante soluble en agua fría y un tinte indicador de color rojo que facilita el recuento de las colonias. (3M Microbiology ,2003, p.6)

Placas Petrifilm Mohos y Levaduras: Estas placas contienen un agente gelificante soluble en agua fría y un nutriente denominado Sabhi. Las levaduras tienen una coloración verde azulada y sus colonias son pequeñas y poseen un punto negro en el centro, mientras que los Mohos presentan colonias grandes y su coloración es variable. (3M Microbiology ,2003, p.8)

1.7 Tinción Gram

Es una técnica de laboratorio que permite separar a las bacterias de acuerdo a la estructura de la pared bacteriana en dos grupos: Gram Positivas y Gram Negativas, basado en si luego de la decoloración retienen o no el colorante cristal violeta. Las bacterias que retienen el colorante aparecen como azules oscuras o violetas y corresponden a las bacterias Gram Positivas ;mientras que las que pierden el colorante cristal violeta y se tiñen con safranina se visualizan de color rosado o fucsia perteneciente a bacterias Gran Negativas. (Castillo y Salavert ., et al . 2012. p. 4)

Pasos para teñir las bacterias con Tinción Gram:

Fijación: se coloca las bacterias en un portaobjetos y se coloca una gota de suero fisiológico, se seca con el mechero o al aire libre para no dañar las células.

- ✓ **Tinción 1:** Se coloca el colorante cristal violeta cubriendo toda la muestra por 1 minuto y se enjuaga con agua
- ✓ **Tinción 2:** Se agrega lugol para incrementar la afinidad del colorante primario con la célula, formando complejos insolubles con este. Se lo realiza durante 1 minuto y se enjuaga con agua
- ✓ **Tinción 3:** El acetona permite que el complejo Cristal violeta-yodo sea removido de la capa de mureina más fina de las bacterias Gram-negativas, mientras que la pared más gruesa de las Gram-positivas retiene el tinte en su interior. Se coloca acetona durante 30 segundos y enjuaga con agua
- ✓ **Tinción 4:** La safranina se utiliza para teñir de rojo las células previamente decolorada como son las bacterias Gram Negativas por 1 minuto, se enjuaga y se deja secar a temperatura ambiente.
- ✓ Se observa al microscopio las bacterias teñidas .(Castillo y Salavert ., et al . 2012. p. 4)

1.8 . Pruebas Bioquímicas

Las pruebas bioquímicas consisten en distintos test químicos aplicados a medios biológicos ,los cuales permiten identificar distintos microorganismos presentes. Su sistema de funcionamiento consiste en determinar la actividad de una vía metabólica a partir de un sustrato que se incorpora en un medio de cultivo y que la bacteria al crecer puede utilizar o no. (Cercenado y Cantón , 2010: p.8)

1.8.1 Prueba de la Catalasa

Esta prueba determina la presencia de la enzima catalasa en las bacterias, la cual hace posible que el peróxido de hidrogeno se descomponga en oxígeno y agua que se libera y produce burbujas. (Cercenado y Cantón , 2010: p.8)

1.8.2 Prueba de la Oxidasa

Sirve para determinar la presencia de enzimas oxidantes. La reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citromooxidasa que activa la oxidación del citocromo el cual es reducido por el oxígeno molecular produciendo agua o peróxido de hidrogeno. Generalmente los organismos que poseen esta enzima son aerobios o anaerobios facultativos siendo la prueba positiva cuando los organismos se desarrollen en presencia de oxígeno tomando una coloración púrpura. (Cercenado y Cantón , 2010: p.15)

1.8.3 Citrato

Esta prueba determina la capacidad que poseen algunos microorganismos de crecer con citrato como única fuente de carbono y sales amoniacales inorgánicas siendo única fuente de nitrógeno que provoca la alcalización del medio que producirá un cambio de color de verde a azul.(Cercenado y Cantón , 2010: p.16)

1.8.4 Reacción de la Ureasa

Determina la capacidad de los microorganismos para hidrolizar la urea separándolas en dos moléculas de amoníaco por acción de la enzima ureasa. Estos productos metabólicos alcalinizan el medio, provocando el viraje del indicador rojo fenol del amarillo al rojo . (Cercenado y Cantón , 2010: p.21)

1.8.5 O.F. de Hugh & Leifson

Esta prueba indica el tipo de metabolismo oxidativo o fermentativo que presentan las bacterias. Para detectar si las bacterias utilizan los carbohidratos por la vía oxidativa o fermentativa se utiliza el agar OF, que contiene agar, peptona y azul de bromotimol como indicador de pH. Inicialmente el medio es de color verde y vira a amarillo cuando el medio se acidifica producto de la fermentación u oxidación del carbohidrato. (Cercenado y Cantón , 2010: p.19)

1.8.6 Kligler Hierro Agar

Esta prueba es utilizada en la identificación de enterobacterias en base a la fermentación de lactosa y glucosa, además de la formación de ácido sulfhídrico. Contiene nutrientes como peptona de carne y tripteína que colaboran en el desarrollo de las bacterias, contiene lactosa y glucosa como carbohidrato. La fermentación de azúcares acidifica el medio lo que indica el cambio de color rojo de fenol a amarillo que es el indicador ácido base incorporada y si no hay fermentación el medio vira a rojo. (Cercenado y Cantón , 2010: p.25)

1.8.7 SIM o Sulfhídrico Indol Movilidad

El SIM es un medio de cultivo semisólido, se emplea para detectar la presencia de la enzima triptofanasa en bacterias, la cual degrada el aminoácido triptófano a indol. Al añadir el reactivo de Erlich produce un compuesto de coloración roja. Es un medio destinado a verificar la producción de indol, sulfuro de hidrogeno y movilidad en un mismo.

Las cepas móviles pueden apreciarse en este medio por la turbidez que producen alrededor de la punción de la siembra. (Cercenado y Cantón , 2010: p.30)

1.9 Antibiograma

El antibiograma permite determinar la sensibilidad de una bacteria frente a diferentes antimicrobianos in vitro y a partir de estos resultados augura la eficacia in vivo. Con un antibiograma se puede determinar si la bacteria es sensible o resistente a un antibiótico siendo estos los resultados cualitativos, o cuantitativos que determinan la concentración mínima inhibitoria (CMI) de antimicrobiano que inhibe el crecimiento bacteriano. (Cercenado y Cantón , 2010: p.45)

El método de difusión en disco Baur-Kirby, es la prueba de inhibición o resistencia de los microorganismos, enfrentándose a fármacos que se encuentran impregnados en pequeños discos.

Sensible: El microorganismo presenta una gran área de inhibición usada por el fármaco con el 95% de éxito. El fármaco inhibe al microorganismo patógeno; puede ser una elección apropiada para el tratamiento.

Resistente: Presenta muy poco o casi nada de halo de inhibición .El fármaco no es efectivo para inhibir el crecimiento del microorganismo; no es un fármaco de elección para el tratamiento si la probabilidad de éxito terapéutico es nula o muy reducida. No es de esperar ningún efecto terapéutico sea cual fuere el tipo de tratamiento.

Intermedia: Presenta un halo de inhibición más reducido Cuando el éxito terapéutico es imprevisible. (Cercenado y Cantón , 2010: p.45)

CAPITULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1 Lugar de Muestreo

Dentro del trabajo de investigación se realizó el análisis microbiológico en la Vertiente del Santuario “Nuestra Señora de la Fuente del Carmelo” del barrio Catequilla ubicado en el cantón Chambo perteneciente a la Provincia de Chimborazo, cuyo objetivo principal investigar la microbiota de la vertiente para determinar la calidad.



Figura 1-2: Vertiente de “Nuestra Señora del Santuario”

Realizado por: IBARRA, Katherine.2017

2.2 . Toma de Muestra

El muestreo se realizó en la Vertiente del Santuario “Nuestra Señora de la Fuente del Carmelo”, se tomaron las muestras de agua en cuatro puntos específicos.

M₁: Tanque de Captación



Figura 2-2: Tanque de Captación

Realizado por: IBARRA, Katherine.2017

En la Figura 2-2 el tanque de captación consta de tres tuberías que transportan aguas de diferentes vertientes, la cual se recolecto la muestra de la tubería que lleva el agua de la M₁ baja desde los pies de la virgen.lugar donde se encuentra el pozo artesiano.

M₂: Fuente de bebida



Figura 3-2: Fuente de bebida

Realizado por: IBARRA, Katherine.2017

En la figura 3-2 indica la red de distribución que baja el agua de la vertiente para el consumo y uso doméstico de las personas.

M₃: Vivienda del sector



Figura 4-2: Vivienda del Sector

Realizado por: IBARRA, Katherine.2017

En la figura 4-2 se la foto de la recolección de la M₃ al cual corresponde a una vivienda del sector en la cual las personas que habitan en el barrio Catequilla hacen uso diario del agua de la vertiente.

M₄: Tanque de Cloración



Figura 5-2: Tanque de Cloración

Realizado por: IBARRA, Katherine.2017

En la figura 5-2 se muestra el sitio de colecta de la M₄ correspondiente al tanque de cloración en donde el agua que llega de distintas vertientes que se encuentran en el sector, tienen su respectivo tratamiento para eliminar posibles bacterias contaminantes y así proveer al Cantón Chambo el agua de óptima calidad.

2.3. Factores de estudio

Población: Son los microorganismos *Aerobios mesófilos*, *Coliformes* totales y fecales, *Staphylococcus*, mohos y levaduras presentes en la Vertiente “Nuestra Señora de la Fuente del Carmelo” del barrio Catequilla perteneciente al Cantón Chambo Provincia de Chimborazo.

2.4.METODOLOGÍA

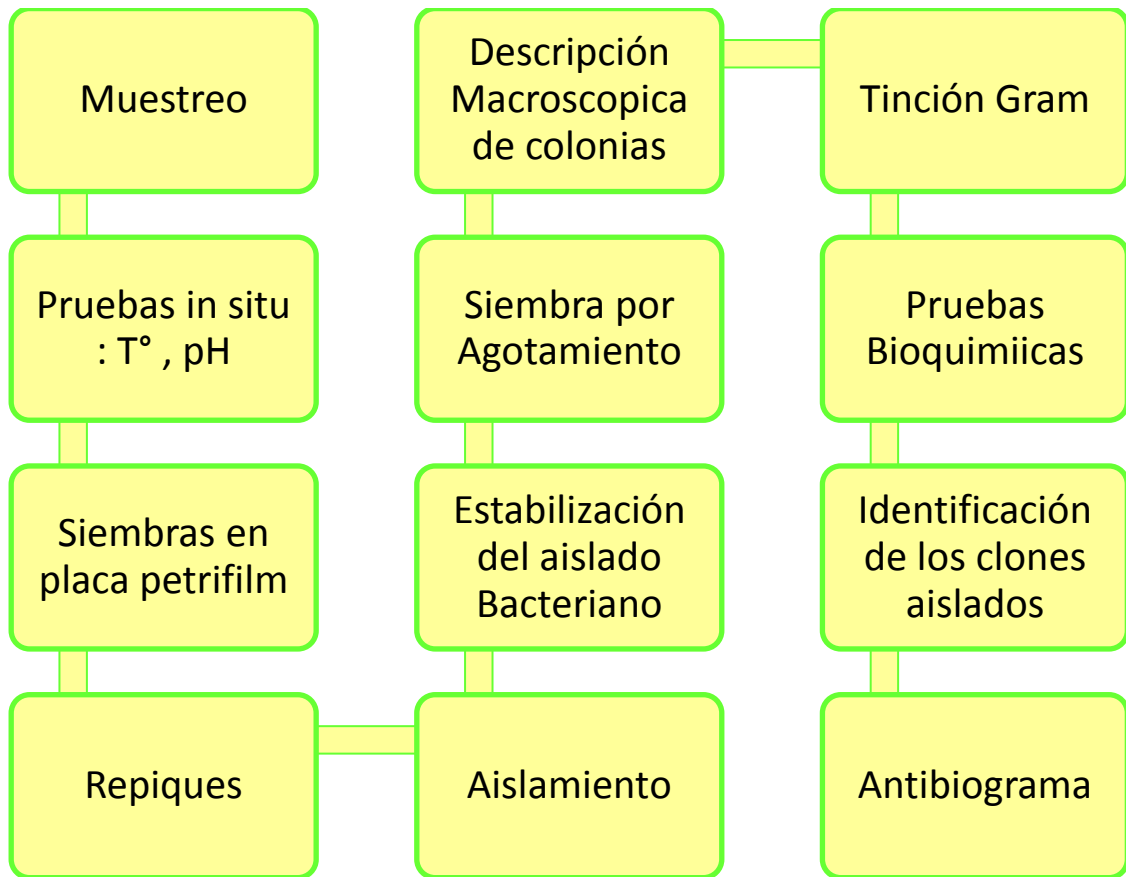


Figura 6-2: Esquema del proceso de Análisis Microbiológico

Realizado por: IBARRA, Katherine.2017

Características del lugar de Investigación

Este trabajo de investigación se realizó en el laboratorio Clínico y Bacteriológico de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias.

PROVINCIA: Chimborazo

CANTÓN: Riobamba

2-5 MATERIALES

Tabla 1-2 Materiales de Laboratorio

| | |
|-------------------------------------|---------------------------|
| Cooler | Lápiz graso |
| Frascos Estériles | Palillos e hisopos |
| Cinta Maskin | Aceite de inmersión |
| Marcador Permanente | Tubos estériles y corchos |
| Cajas Petri | Gradillas |
| Mechero de alcohol | Goteros |
| Puntas amarillas | Tiras indicadoras de pH |
| Puntas azules | Termómetro |
| Pipetas automáticas | Fundas de tela |
| Guantes | Fundas rojas |
| Cofias | Regla |
| Mascarilla | Algodón |
| Mandil | Papel aluminio |
| Asa de platino | Gasa |
| Probeta de 250ml | Vaselina estéril |
| Erlenmeyer 250 y 150 mL | Pizeta |
| Varillas de agitación | Espátula |
| Vasos de precipitación 250 y 150 mL | Tiras de oxidasa |
| Pera de succión | Cuaderno de apuntes |
| Reverbero | Alcohol |
| Placas portaobjetos | Discos de sensibilidad |
| Placas cubreobjetos | Tijeras |

Realizado por: IBARRA, Katherine.2017

Tabla 2-2: Equipos de Laboratorio

| | |
|-------------------------|-------------------|
| Cámara de Flujo Laminar | Microscopio |
| Estufa Bacteriológica | Refrigeradora |
| Autoclave | Balanza Analítica |

Realizado por: IBARRA, Katherine.2017

Tabla 3-2: Reactivos

| |
|-------------------|
| Agua destilada |
| Erlich |
| Agua Oxigenada |
| Suero Fisiológico |
| Cristal violeta |
| Lugol |
| Alcohol –Cetona |
| Safranina |

Realizado por: IBARRA, Katherine.2017

Tabla 4-2: Medios de Cultivo

| | |
|---|--------------------------|
| Placas 3M Petrifilm™ Aerobios totales | Agar Mac-Conkey |
| Placas 3M Petrifilm™ <i>E. coli</i> /Coliformes | Agar Manitol Salado |
| Placas 3M Petrifilm™ <i>Staph Express</i> | Agar de Hierro Kliguer |
| Placas 3M Petrifilm™ Mohos y Levaduras | Agar Salmonella Shigella |
| Agar Hugh-Leifson O-F | Medio SIM |
| Agar Eosina Azul de Metileno | Agar Urea y Citrato |

Realizado por: IBARRA, Katherine.2017

2.6 Recolección de la Muestra

2.6.1 Muestreo

En el trabajo de investigación se tomó la muestra de la vertiente “Nuestra Señora de la Fuente del Carmelo”, en donde; la M₁ se recolecto de la tubería que transporta el agua que baja desde los pies de la virgen que se encuentra en la iglesia de donde proviene el pozo artesiano; él agua que es transportada por esta tubería se deposita en el tanque de captación en el cual fluyen tres vertientes más. La M₂ fue recolectada en la fuente de bebida donde los habitantes y visitantes que acuden al lugar utilizan para su consumo y uso doméstico; la M₃ se recolecto en una vivienda del sector y la M₄ fue tomada en el tanque de cloración en donde llegan todas las aguas provenientes de vertientes por diferentes tuberías para su tratamiento, posteriormente las aguas ya tratadas bajan al Cantón Chambo mediante las redes de distribución. Los muestreos se realizaron por duplicado.

2.6.1.1 Toma de Muestra

En la recolección de la muestra se utilizarán recipientes estériles. Se realizaron tres lavados con la misma agua antes de recoger la muestra definitiva, se tapó el recipiente, se selló y finalmente se codificó para ser transportada al laboratorio mediante un cooler.

2.6.2 Análisis Físico-Químicos

Los análisis se realizarán in situ mediante un termómetro manual y tiras indicadoras de pH para realizar la determinación correspondiente de los valores de pH y temperatura en cada uno de los sitios de muestreo.

2.6.3 Análisis Microbiológico

El análisis microbiológico se realizó en la cámara de flujo laminar con las medidas de asepsia correspondientes. La siembra de la muestra de agua se realizó dentro de la cámara de flujo laminar, en una superficie plana en Placas 3M Petrifilm™ específico para cada microorganismo, como son: *aerobios mesófilos*, *E.coli/coliformes*, *Staphylococcus aureus*,

mohos y levaduras. Cada placa fue codificada con el número correspondiente del sitio de la muestra.

2.6.3.1 Placas 3M Petrifilm™

- ✓ Colocar en la placa petrifilm respectiva (*Aerobios*, *E. coli*/ *Coliformes*, *Staphylococcus aureus*, mohos y levaduras) 1mL de la muestra.
- ✓ Incubar a 37°C por 24 horas, excepto para mohos y levaduras, en la que varía a 25°C por un periodo de 7 días.
- ✓ Realizar conteo y expresar los resultados como unidades formadoras de colonias por mililitro (ufc/ml).

2.6.3.2 Selección de Clones

Se seleccionaron 21 clones para su respectiva siembra por agotamiento de las placas pertenecientes a coliformes/*E.coli*, aerobios mesófilos y *Staphylococcus*.

2.6.4 Estabilización del Aislado Bacteriano y Aislamiento por Agotamiento

En esta técnica realizarán al menos cuatro repiques sucesivos para garantizar que las colonias aisladas estén adaptadas al medio que sea utilizado en el resto del trabajo.

Se preparó Agar Mueller Hinton que es un medio de cultivo no selectivo que promueve el crecimiento bacteriano para la identificación.

- Se realizó el primer repique y mediante el uso de un palillo estéril se tomó una parte de la colonia y se picó sobre la placa de Muller Hinton, haciendo uso de una cuadrícula que sirvió de guía para la siembra de colonias. Se incubó a una temperatura de 37°C por 24 horas y se observó las características macroscópicas.
- Se realizaron 7 repiques partiendo de las colonias que siguieron creciendo trasladando a otra caja para la continuación de los mismos, del último repique se tomó cada colonia crecida para realizar una siembra por agotamiento.

- Se extendió la muestra con suavidad sobre la superficie del medio de cultivo, siendo lo más largo posible con el fin de conseguir células aisladas representadas en la fig.(7-2)
- Cerrar la placa e incubar de manera invertida a una temperatura de 37°C durante 24 horas.

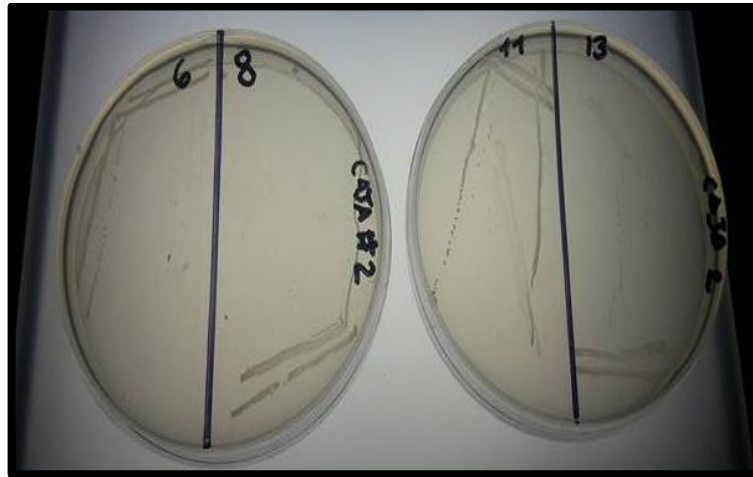


Figura 7-2: Cepas Puras

Realizado por: IBARRA, Katherine.2017

2.6.5 Descripción Macroscópica de las Colonias

Del proceso del aislado por agotamiento se seleccionaran clones bacterianos los cuales fueran evaluados macroscópicamente utilizando la tinción de Gram para luego realizar la descripción de la morfología y macroscópica para así realizar una caracterización de los microorganismos, conducente a su clasificación y profundización en su fisiología y propiedades susceptibles de ser valoradas o aplicadas en diferentes casos.

Tamaño: Realizó a simple vista, utilizando una lupa, se mide en mm.

- Pequeñas: Colonias de hasta 1mm de diámetro
- Medianas : Colonias entre 1 y 4 mm de diámetro
- Grandes :Colonias mayores a los 4 mm de diámetro

Morfología: Para la evaluación de la morfología considerando características como: (Fig 8-2)

- Bordes : ondulado , entero y filamentosos
- Consistencia : Membranosa y cremosa
- Superficie : rugosa , lisa y plegada

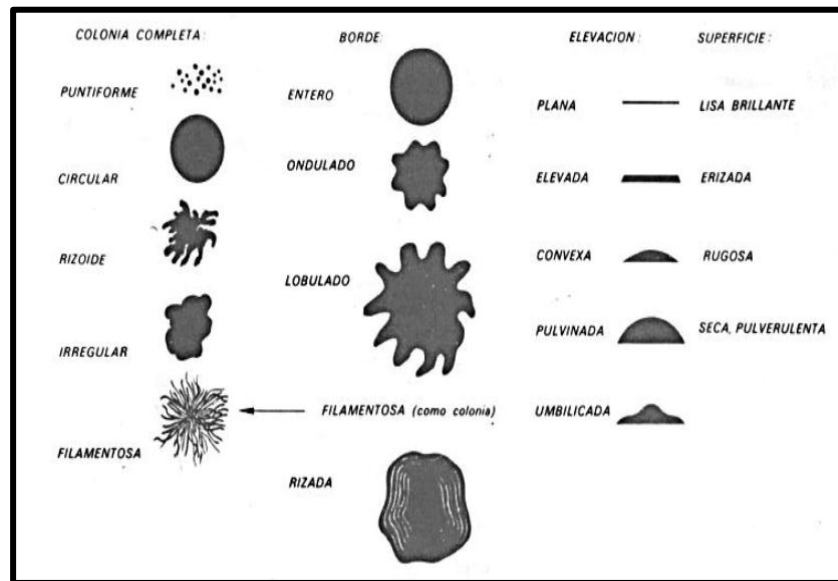


Figura 8-2: Caracteres de una colonia en medio sólido

Fuente: https://www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02_Capitulo_02.pdf.

Elevación: plana, elevada y convexa

Pigmentación: La producción de pigmentos ha sido descrita para ciertas especies como *Staphylococcus* que tienen una coloración amarilla mientras que en las *Pseudomonas* poseen un pigmento verdoso.

2.6.6 Tinción Gram

La tinción Gram es una técnica de coloración que nos permite separar dos grupos de bacterias los Gram Positivas que se tiñen de color violeta azulado y las bacterias Gram negativas de color rojo-rosado permitiendo su diferenciación. (Castillo y Salavert ., et al . 2012. p. 8)

Procedimiento:

- En una placa portaobjetos seguidamente codificado se colocó una gota de suero fisiológico y con la ayuda del asa de platino se tomó una pequeña cantidad de la colonia y se mezcló con la solución.

- Con la ayuda del mechero se fijó la muestra.
- A la muestra fijada se colocó cristal violeta durante un minuto y se le enjuago.
- Posteriormente se colocó lugol por un minuto y se retiró con agua, seguidamente se puso alcohol acetona por 30 segundos y finalmente se recubrió la placa con safranina por un minuto se enjuagó dejándolo secar a temperatura ambiente.
- Luego se colocó una gota de aceite de inmersión en la muestra fijada para continuar con la lectura al microscópico con la ayuda del lente de 100 x.

2.6.7 Preparación de Medios de Cultivo

2.6.7.1 Agar – Mueller Hinton, Eosina azul de Metileno, Manitol Salado, MacConkey, Salmonella-Shigella.

- Se pesó en papel aluminio la cantidad de medio de cultivo en gramos.
- En un matraz de vidrio se colocó la cantidad pesada y se disolvió en 1000 mL de agua destilada
- Se agito el matraz llevando a ebullición para que tenga una buena disolución.
- Cada matraz fue sellado por papel aluminio para evitar contaminaciones.
- Se colocó cada matraz en el autoclave a una temperatura de 121°C durante 25 minutos para su esterilización.
- Se dejó enfriar a una temperatura que soporte la palma de la mano y se colocó en las cajas Petri.

2.6.7.2 Pruebas Bioquímicas: Kligler, SIM, Urea y Citrato

❖ Establecidas para las bacterias Gram Negativas:

Agar Hierro Kligler

1. Suspender los gramos establecidos en la cantidad de agua requerida (52 g en 1000 ml de agua destilada)
2. Calentar hasta que sus partículas se encuentren disueltas
3. Esterilizar en el autoclave a 121°C durante 15 minutos

4. Distribuir en tubos estériles 4 mL, en forma de pico de flauta y cerrar con los corchos estériles.
5. Calentar la aguja de inoculación, enfriar y tocar la colonia que se va a sembrar en el tubo
6. Flamear el tubo
7. Sembrar en estriar la superficie del pico de flauta
8. Calentar la aguja después de la inoculación
9. Incubar a 37°C durante 24 horas

Interpretación de Resultados

- Se determinó la fermentación de glucosa cuando el tubo presenta una coloración amarilla en la parte inferior.
- Fermenta lactosa cuando presenta coloración amarilla en la parte superior del tubo.
- Presenta una coloración amarilla en todo el tubo cuando ha fermentado glucosa y lactosa.
- Cuando el tubo mantiene el medio de color rojo que es su color original indica que la prueba es negativa, es decir que no existe la presencia de ningún azúcar.
- Si existe la presencia de gas H₂S el medio tomara una coloración negra.

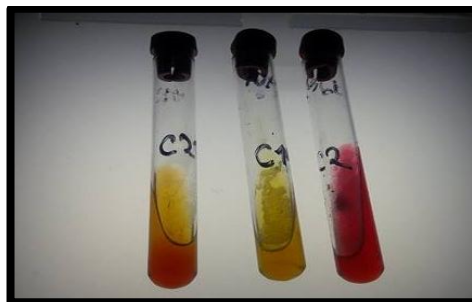


Figura 9-2: Prueba Bioquímica Agar Kliguer

Realizado por: IBARRA, Katherine.2017

Agar Base Urea

1. Suspender los gramos establecidos en la cantidad de agua requerida (24 g en 1000 ml de agua destilada)
2. Calentar hasta que sus partículas se encuentren disueltas
3. Esterilizar en el autoclave a 121°C durante 15 minutos
4. Añadir una solución estéril de urea (100mL para 1L de medio). Esta solución se realiza al 5%, es decir se pesan 29g de urea deshidratada y se disuelven en 100mL de agua destilada. Se esteriliza por filtración, puesto que el calor desnaturaliza la urea.

5. Distribuir en tubos estériles en forma de pico de flauta y cerrar con corchos .
6. Calentar la aguja de inoculación , enfriar y tocar la colonia que se va a sembrar en el tubo
7. Flamear el tubo
8. Sembrar en estriar la superficie del pico de flauta
9. Calentar la aguja después de la inoculación
10. Incubar a 37°C durante 24 horas

Interpretación de Resultados

- Un color rosado en el agar indica un resultado positivo.
- La prueba es negativa si mantiene el color original del medio.

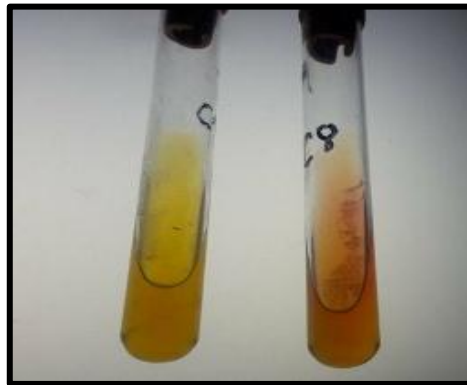


Figura 10-2: Prueba –Urea

Realizado por: IBARRA, Katherine.2017

Agar Simmons Citrato

Se utilizó como medio de cultivo el Simmons citrato, para lograr determinar si la bacteria utiliza citrato como única fuente de carbono. (Antonio y Nieto., et al . 2010. p. 11)

1. Suspender los gramos establecidos en la cantidad de agua requerida (24.2 g en 1000 ml de agua destilada)
2. Calentar hasta que sus partículas se encuentren disueltas
3. Esterilizar en el autoclave a 121°C durante 15 minutos
4. Distribuir 4 ml en los tubos estériles
5. Calentar la aguja de inoculación , enfriar y tocar la colonia que se va a sembrar en el tubo
6. Flamear el tubo
7. Sembrar en estriar la superficie del pico de flauta

8. Calentar la aguja después de la inoculación
9. Incubar a 37°C durante 24 horas

Interpretación de Resultados

- La positividad de la prueba se confirma si se observa el crecimiento sobre el pico de flauta o si existe una variación de color verde a azul, debido a la alcalinización del medio, ocasionado por la liberación de sodio del citrato utilizado. (ÁLVAREZ, María., & BOQUET, Ernesto. 1990. p. 140).

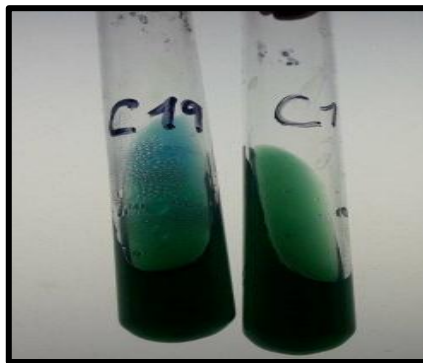


Figura 11-2: Prueba Citrato

Realizado por: IBARRA, Katherine.2017

Medio SIM (Sulfuro-Indol-Movilidad)

El método SIM permite verificar la movilidad, producción de SH_2 que producen los microorganismos. Este medio sirve para diferenciar a la familia Enterobacteriaceae. (Antonio y Nieto., et al . 2010. p. 17)

1. Suspender los gramos establecidos en la cantidad de agua requerida (30g en 1000 ml de agua destilada)
2. Calentar hasta que sus partículas se encuentren disueltas
3. Esterilizar en el autoclave a 121°C durante 15 minutos
4. Distribuir 4 ml en los tubos estériles
5. Calentar la aguja de inoculación , enfriar y tocar la colonia que se va a sembrar en el tubo
6. Sembrar en estriar la superficie del pico de flauta
7. Calentar la aguja después de la inoculación
8. Incubar a 37°C durante 24 horas
9. Al finalizar el momento de incubación se colocó unas gotas del reactivo de erlich y se agito lentamente.

Interpretación de Resultados

Movilidad

- Se produce una turbidez en el medio, esta debe extenderse más allá de la línea de siembra.

Producción de SH₂

- **Positivo:** Existe una coloración negra en el medio de cultivo
- **Negativo:** El medio no cambia de color

Prueba de Indol

- Se añade al medio de cultivo unas 3 gotas del reactivo de Erlich
- **Positivo:** Existe una coloración roja o la formación de un anillo rojo.
- **Negativo:** El color del reactivo revelador no cambia y permanece de incoloro -amarillo.
(ÁLVAREZ, María., & BOQUET, Ernesto. 1990. p. 140).

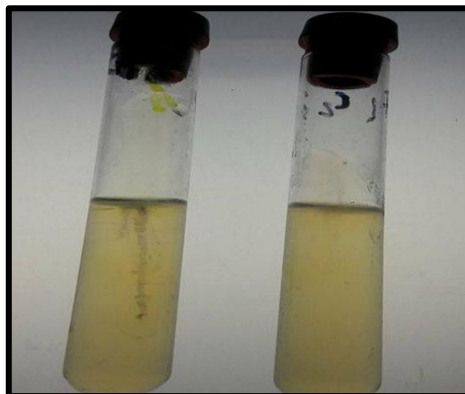


Figura 12-2: Prueba SIM

Realizado por: IBARRA, Katherine.2017

2.6.7.3 Identificación bacteriana de colonias aisladas

2.6.7.3.1 Método de la Prueba de Catalasa

1. Tomar una pequeña muestra de colonia en un portaobjeto y se coloca una gota de agua oxigenada.

2. Observar si existe desprendimiento de burbujas , lo que indica que es una prueba positiva
(Antonio y Nieto., et al . 2010. p. 26)



Figura 13-2: Prueba –Catalasa

Realizado por: IBARRA, Katherine.2017

2.6.7.3.2 Método de la Prueba de Oxidasa

1. Con una tira para prueba de oxidasa tocar la colonia recién reactivada.
2. Observar el resultado: Si la tira se torna azul se considera oxidasa positiva, sino existe ningún cambio se considera oxidasa negativa. (Antonio y Nieto., et al . 2010. p. 27)

2.6.4 Identificación de Cocos Gram positivos

2.6.4.1 Método de la Prueba de Na Cl 6,5%

La prueba de Cloruro de sodio permite determinar los microorganismos que pueden desarrollarse en un medio salino.

Procedimiento

- Con la ayuda de una pipeta de 1000 uL colocamos en un tubo de ensayo la solución cloruro de sodio.
- Se tomó la colonia con un hisopo estéril y se procedió a homogenizar la muestra en el cloruro de sodio.
- Se incubó a temperatura de 37 °C durante 24 horas.
- Finalmente después del tiempo transcurrido se observaron los cambios ocurridos.

Interpretación de Resultados

- Positivo : Cambio de coloración de púrpura a amarillo
- Negativo : Inexistencia de Turbidez

2.6.4.2 Método de Siembra en Agar Manitol Salado

Facilita el crecimiento de bacterias Gram positivas al mismo tiempo que inhibe a las Gram negativas.

Procedimiento

- Con la aza de platino esterilizada se tomó una colonia del agar Muller Hinton, mediante un estriamiento se procedió a la inoculación.
- Se incubó en estufa a 35-37°C durante 24 horas
- Se observó resultados

Interpretación de Resultados

- El crecimiento de colonias amarillas acompañadas o no de un halo indica la presencia de un microorganismo fermentador.
- El crecimiento de colonias que forman un halo coloración rojo púrpura indican que no fermenta manitol.

2.6.5 Identificación de Bacilos Gram Negativos

2.6.5.1 Método de siembra en Agar E.M.B

Es un medio selectivo que permite aislar bacilos Gram negativos, especialmente de la Familia Enterobacteriaceae.(Apella y Araujo ,2012, p. 1)

Procedimiento

- Se tomó la colonia, con la aza esterilizada y se estrió en el agar E.M.B.

- Se incubó a 35-37°C por 24 horas
- Se realizó la lectura de las cajas sembradas

Interpretación de Resultados

La presencia de un color verde con brillo metálico revela la presencia de *Echerichia coli*. Cuando presenta la misma coloración del medio puede tratarse de otro microorganismo.

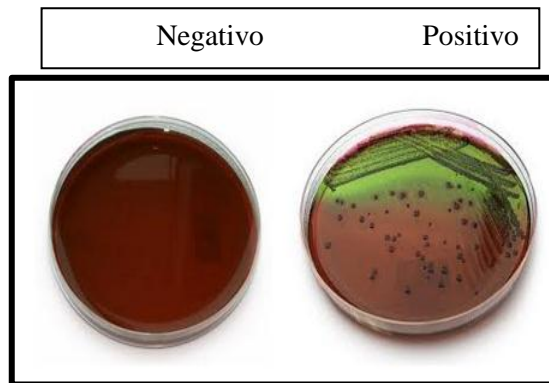


Figura 14-2: Prueba –E.M.B

Realizado por: IBARRA, Katherine.2017

2.6.5.2 Método de siembra en Agar MacConkey

Este medio permite aislar los microorganismos que son fermentadores o no de lactosa como *Salmonella* y *Shigella*.

Procedimiento

- Se tomó una muestra de colonia, con la aza esterilizada y se estiró en el agar MacConkey.
- Se incubó a 35-37°C por 24 horas
- Se realizó la lectura de las cajas sembradas

Interpretación de Resultados

- La presencia de colonias rosadas rojizas denotan la presencia microorganismo fermentadores de lactosa.
- Si el medio no cambia de color los microorganismos no son fermentadores de lactosa.



Figura 15-2: Prueba Mac-Conkey

Realizado por: (Antonio y Nieto., et al . 2010. p. 36)

2.6.5.3 Método de siembra agar *Salmonella Shigella*

Es un medio selectivo y de diferenciación para el aislamiento de bacilos entéricos patógenos, en especial los pertenecientes al género *Salmonella*, a partir de muestras clínicas. (Antonio y Nieto., et al . 2010. p. 38)

Procedimiento

- Se tomó una muestra de colonia, con el aza estéril y se estrió en el agar *Salmonella-Shigella*.
- Se incubó a 35-37°C por 24 horas
- Se realizó la lectura de las cajas sembradas

Interpretación de Resultados

- La presencia de colonias rosadas o rojizas denotan el crecimiento de microorganismos fermentadores de lactosa.
- La presencia de colonias incoloras denotan la presencia microorganismos no fermentadores de lactosa y las colonias presentan un color negro cuando producen H₂S .

2.6.5.4 Método de Inoculación en el medio Hugh Leifson (O.F.)

Es un medio que se utiliza como prueba bacteriana para saber el metabolismo oxidativo-Fermentativo de los carbohidratos .(Antonio Nieto , 2011 ,P.3)

Procedimiento

- Con la aguja del aza previamente estéril se tomó una cantidad una muestra y se punzó en línea recta en los tubos con el medio de cultivo.
- Se añadió 1 mL de vaselina estéril a uno de los tubos para incubar en un ambiente de anaerobiosis ; el otro tubo quedo expuesto en un ambiente con aire (aerobiosis)
- Se incubaron a 37 °C por 15 días
- Diariamente se realizaron las lecturas correspondientes

Interpretación de Resultados

- **Positivo:** Cambio de coloración de verde a amarillo (tubo sin vaselina)
- **Negativo:** No existe coloración en ninguno de los dos tubos
- Cambio de coloración de verde a amarillo en los dos tubos indica la presencia de microorganismos fermentadores de hidratos de carbono.

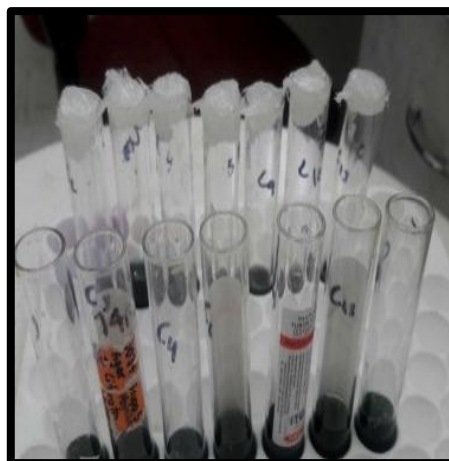


Figura 16-2: Prueba O.F.

Realizado por: IBARRA, Katherine.2017

2.6.6 Identificación de bacterias

Al realizar todas las pruebas mencionadas se comparan los resultados con lo presentado en la bibliografía permitiéndonos clasificar a las bacterias en familia, género, especie, tipo y cepa, permitiendo diferenciar si el microorganismo es patógeno y deducir los posibles mecanismos de resistencia del microorganismo. (Castillo y Salavert ., et al . 2012. p. 2)

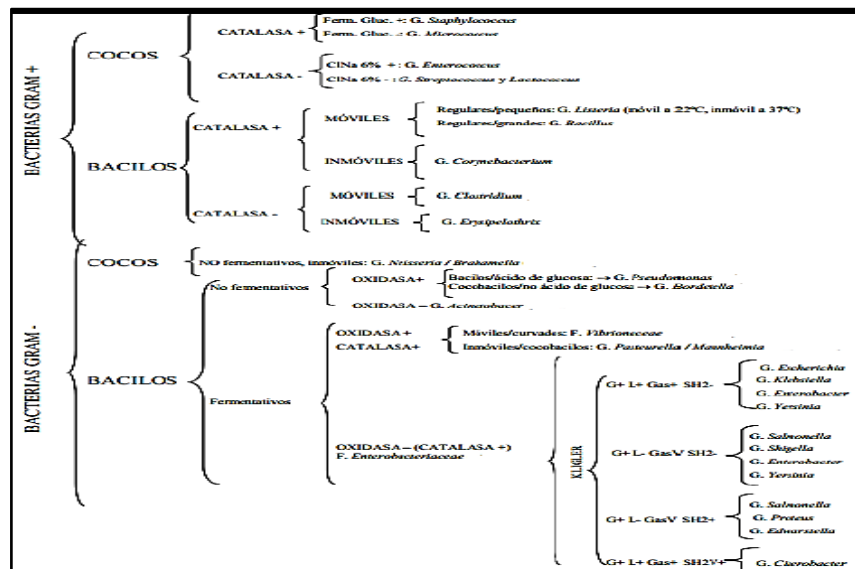


Figura 17-2: Esquema de la identificación de los microorganismos

Realizado por: (Álvarez, E. BOQUET 2013)

2.6.7. Antibiograma

El antibiograma es una prueba microbiológica que sirve para determinar la sensibilidad de una bacteria a uno o varios antibióticos, permitiendo obtener información sobre el nivel de sensibilidad o resistencia de una bacteria pudiendo clasificarla en: (Cantón, 2017, p. 375)

- Sensible, si existe una buena probabilidad de éxito terapéutico en el caso de un tratamiento a la dosis habitual.
- Resistente, si la probabilidad de éxito terapéutico es nula o muy reducida. No es de esperar ningún efecto terapéutico sea cual fuere el tipo de tratamiento.
- Intermedia, cuando el éxito terapéutico es imprevisible (Cantón, 2017, p. 375)



Figura 18-2: Antibiograma

Realizado por: IBARRA, Katherine.2017

Procedimiento

- Tomar una pequeña muestra de la colonia con un hisopo estéril y se suspendió en un tubo con suero fisiológico.
- Se agito hasta obtener una solución homogénea
- Se tomó el hisopo que contenía la muestra y se estrió en toda la placa del medio de cultivo Mueller Hinton .
- Con la ayuda de una pinza se colocó 9 tipos de discos de sensibilidad en la placa.
- Se incubo durante 24 horas a una temperatura de 37°C
- Finalmente se procedió a la medición de los halos producidos por los discos de sensibilidad con respecto a los microorganismos presentes.

Discos utilizados para Cocos Gram Positivos

- Gentamicina (CN)
- Amikacina (AK -30)
- Ceftriaxona (CRO-30)
- Ciprofloxacina (CIP-5)
- Penicilina (P-10)
- Tetraciclina (TE-30)
- Ampicilina (AM-10)
- Vancomicina (VA-30)

- Amoxicilina / Ac. Clavulánico (AMC-30)
- Trimetoprima / Sulfametoxazol (SXT-25)

Discos utilizados para Bacilos Gram Negativos

- Ciprofloxacina (CIP-5)
- Ampicilina (AM-10)
- Kanamicina (K-30)
- Eritromicina (E-15)
- Tetraciclina (TE-30)
- Nitrofurantoina (F-300)
- Trimetoprima / Sulfametoxazol (SXT-25)
- Gentamicina (CN-10)
- Amoxicilina / Ac. Clavulánico (AMC-30)

CAPITULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

3.1 Determinación de la temperatura y el pH del H₂O de la Fuente.

Tabla 1-3: Análisis Físico Químico del Agua

| PARAMETRO | VALOR | | | | | PROMEDIO |
|------------------------------|------------------|-------|-------|-------|-------|----------|
| | | M_1 | M_2 | M_3 | M_4 | |
| Temperatura (°C) | T ₁ | 16 | 16 | 15,7 | 15 | 15,7 |
| | T ₂ | 16 | 16 | 15,6 | 15,4 | |
| pH | pH ₁ | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 |
| | pH ₂ | 7 | 7 | 7 | 7 | |
| Temperatura ambiente (°C) | T.a ₁ | 10 | 10 | 10 | 10 | 11 |
| | T.a ₂ | 12 | 12 | 12 | 12 | |

Realizado por: Katherine Ibarra ,2017

En la tabla 1-3 se observan los resultados obtenidos para la determinación de los parámetros físico-químicos del agua de la vertiente de Catequilla perteneciente al Cantón Chambo. La temperatura promedio de este afluyente es 15,7°C y la temperatura ambiente es 11 °C, lo que demuestra que este manantial es 4.7°C mayor a la temperatura ambiente, que comparando con lo que dice (BURBANO, et al. 2013), clasifica a este tipo de aguas como frías como menor a 20°C.

La temperatura y el pH afectan directamente al desarrollo bacteriano. Caimanque (2014) indica que la temperatura es uno de los parámetros representativos que condicionan el crecimiento y supervivencia de los microorganismos y en cuanto al pH cada especie tiene un intervalo para crecer, la mayoría de bacterias crecen entre un pH 5.5 a 8; el valor del pH fue 7, indicando que es neutra, valor que se asemeja con el estudio del (INAMHI, 2013) que reporto un valor a 7.1 para agua fría siendo un parámetro ideal para el crecimiento y desarrollo bacteriano.

3.2 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

3.2.1 Análisis de bacterias Aerobias Mesófilas de la Vertiente del Santuario “Nuestra Señora de la Fuente del Carmelo”

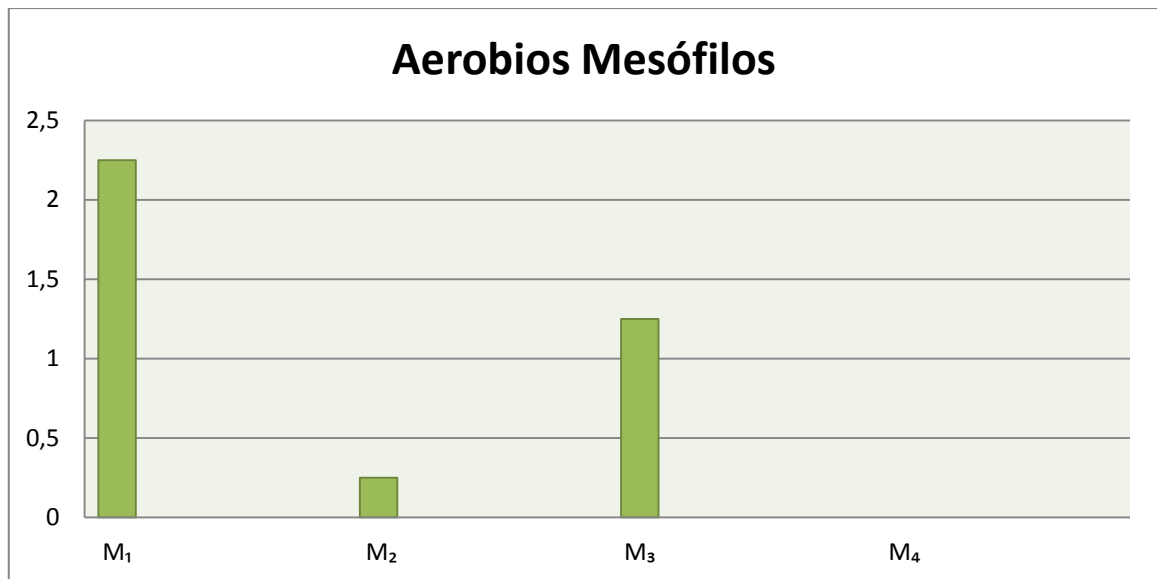
Tabla 2-3: Recuento e bacterias Aerobias Mesófilas

| SITIO DE MUESTREO | MUESTRA | (UFC/MI) | MEDIA | DESVIACIÓN ESTÁNDAR | VARIANZA |
|----------------------|----------------|----------|-------|---------------------|----------|
| <i>M₁</i> | A ₁ | 2 | 2,25 | 3,304037934 | 8,1875 |
| | B ₁ | 0 | | | |
| | A ₂ | 7 | | | |
| | B ₂ | 0 | | | |
| <i>M₂</i> | A ₁ | 0 | 0,25 | 0,5 | 0,1875 |
| | B ₁ | 0 | | | |
| | A ₂ | 1 | | | |
| | B ₂ | 0 | | | |
| <i>M₃</i> | A ₁ | 0 | 1,25 | 2,5 | 4,6875 |
| | B ₁ | 0 | | | |
| | A ₂ | 5 | | | |
| | B ₂ | 0 | | | |
| <i>M₄</i> | A ₁ | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | B ₁ | 0 | | | |
| | A ₂ | 0 | | | |
| | B ₂ | 0 | | | |
| TOTAL | | 15 | 3,75 | 6,30 | 13,0 |

Realizado por: Katherine Ibarra 2017

A₁: Muestra tomada el 21/01/17; B₁: Duplicado

A₂: Muestra tomada el 23/01/17; B₂: Duplicado



Gráfica 1-3: Recuento Aerobias Mesófilas de la Vertiente del Santuario de” Nuestra Señora de la Fuente del Carmelo”

Realizado por: Katherine Ibarra 2017

La gráfica 1-3 indica que existe un bajo crecimiento bacteriano en las muestras. Siendo M₁ que muestra mayor crecimiento esto se puede deber que el sitio corresponde a un lugar confinado donde confluyen aguas de diferentes fuentes con largos recorridos por tuberías donde puede existir agentes contaminantes. Menciona que las Bacterias aeróbicas pueden formar compuestos férricos que se adhieren a las tuberías favoreciendo el crecimiento bacteriano pudiendo causar un foco de contaminación. En M₃ existe crecimiento bacteriano pero relativamente bajo en los días de muestreo debido a que la toma se lo realizo en un grifo del tanque de lavar y este sitio se encuentra expuesto al medio ambiente; en la M₄ no existe crecimiento debido a que este sitio se lleva a cabo el tratamiento de cloración para eliminar las bacterias presentes en el agua para que se encuentre libre de patógenos.

De acuerdo al código sanitario Mexicano se establece que el recuento de aerobios mesófilos no debe sobrepasar de 200 UFC/ mL, comparando con los resultados de esta investigación los valores obtenidos están muy por debajo de la norma (4 UFC/ mL) demostrándose que en referencia a esta norma el agua es de buena calidad como lo indica (Andueza ,2015)

3.2.2 Análisis de bacterias *E.coli*

El análisis de las bacterias Coliformes/*E.coli* no existió crecimiento en el agua de esta vertiente, lo que indicaría que los sitios de muestreo se encuentran adecuadamente al medio, y contacto directo con personas y animales. Este pozo artesiano está protegido por cemento, y el agua que emerge es transportada por tuberías evitando que entre en contacto con el medio ambiente. El Gobierno Descentralizado del Cantón Chambo ha realizado esta obra con el afán de transportar el agua de esta vertiente mediante redes de distribución para facilitar a sus habitantes y devotos la recolección de la misma para los diversos usos. La presencia de *E.coli* en el agua indicaría una fuerte contaminación fecal, la cual no fue determinada en este estudio.

Según Tulsma (2015) en anexo VI para aguas subterráneas debe encontrarse libre de coliformes fecales y totales para que sea una agua apta para el consumo humano. Comparando los resultados obtenidos con los del mantamiento de Valdeja () el estudio de la microbiota indicó que no hubo presencia de indicadores fecales cumpliendo con la normativa de agua de consumo humano.

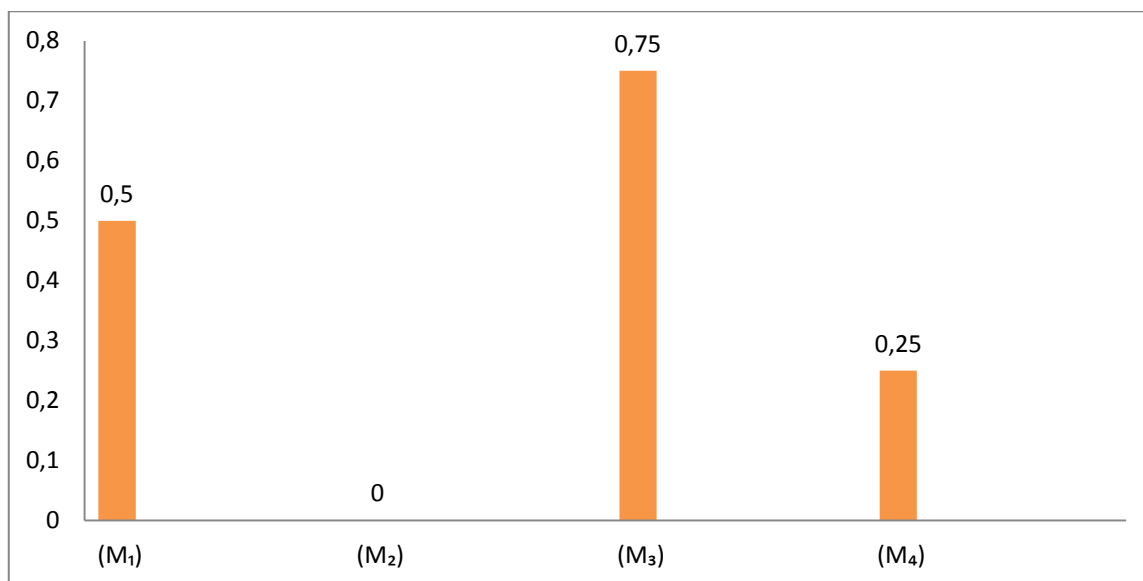
3.2.3 Análisis de Bacterias del género *Staphylococcus* de la Vertiente del Santuario “Nuestra Señora de la Fuente del Carmelo”

Tabla 3-3: Recuento de Bacterias del género *Staphylococcus* de la Vertiente del Santuario “Nuestra Señora de la Fuente del Carmelo”

| SITIO DE MUESTREO | MUESTRA | (UFC/MI) <i>Staphylococcus</i> | MEDIA | D. ESTÁND | VAR. |
|----------------------|----------------|-----------------------------------|-------|-----------|------|
| <i>M₁</i> | A ₁ | 1 | 0,5 | 0,58 | 0,34 |
| | B ₁ | 0 | | | |
| | A ₂ | 1 | | | |
| | B ₂ | 0 | | | |
| <i>M₂</i> | A ₁ | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | B ₁ | 0 | | | |
| | A ₂ | 0 | | | |
| | B ₂ | 0 | | | |
| <i>M₃</i> | A ₁ | 1 | 0,75 | 0,5 | 0,25 |
| | B ₁ | 0 | | | |
| | A ₂ | 1 | | | |

| | | | | | |
|----------------------|----------------|----------|--------------|-------------|--------------|
| | B ₂ | 1 | | | |
| | A ₁ | 0 | | | |
| | B ₁ | 0 | | | |
| | A ₂ | 0 | | | |
| M₄ | B ₂ | 0 | 0,25 | 0,5 | 0,25 |
| TOTAL | | 5 | 0,375 | 0,27 | 0,024 |

Realizado por: Ibarra Katherine, 2017



Gráfica 2-3: Recuento de Bacterias del género *Staphylococcus* de la Vertiente del Santuario de” Nuestra Señora de la Fuente del Carmelo”.

Realizado por: Ibarra Katherine ,2017

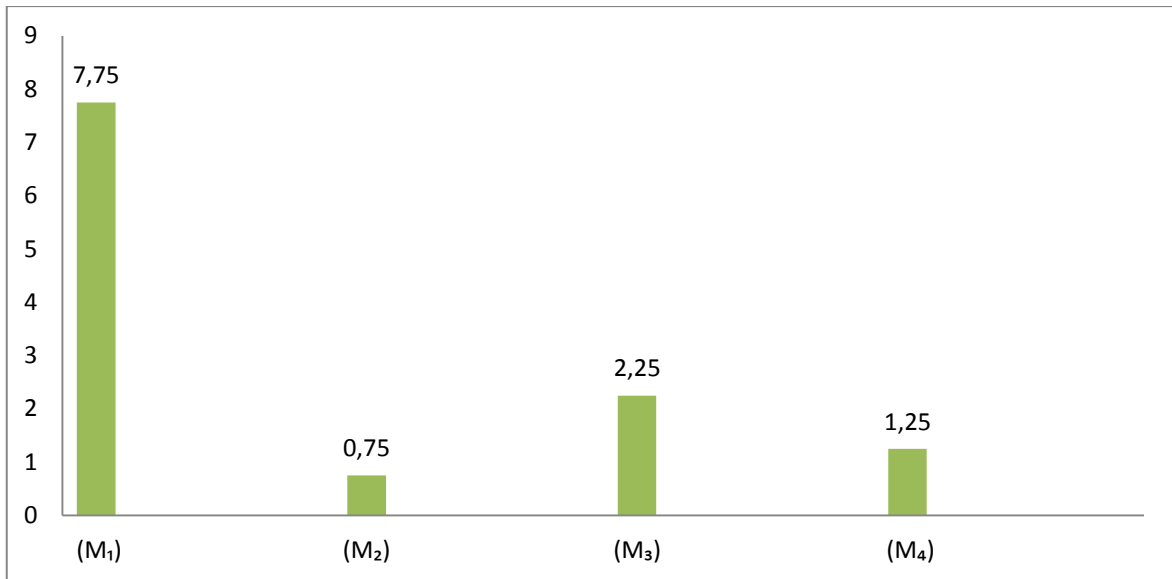
En la tabla 4-3 se presenta los resultados obtenidos estableciendo que no existe crecimiento bacteriano significativo en las muestras M₁, M₃ y M₄ debido a que el agua de la vertiente no se encuentra en contacto directo con seres humanos y animales debido a que el agua es transportada de manera subterránea mediante redes de distribución no están de expuestas al medio ambiente.

3.2.4 Análisis de Mohos y Levaduras

Tabla 4-3: Recuento de del Mohos y Levaduras de la Vertiente del Santuario de” Nuestra Señora de la Fuente del Carmelo”.

| SITIO DE MUESTREO | MUESTRA | (UFC/MI) | | | D.ESTÁNDAR | VARIANZA |
|----------------------|----------------|-----------|------------|------------|--------------|----------------|
| | | MOHOS | LEVADURAS | TOTAL | | |
| <i>M₁</i> | A ₁ | 10 | 36 | 46 | 12,16 | 147,92 |
| | B ₁ | 0 | 10 | 10 | | |
| | A ₂ | 0 | 4 | 4 | | |
| | B ₂ | 0 | 2 | 2 | | |
| <i>M₂</i> | A ₁ | 7 | 25 | 32 | 8,5314 | 72,7857 |
| | B ₁ | 0 | 8 | 8 | | |
| | A ₂ | 0 | 6 | 6 | | |
| | B ₂ | 0 | 0 | 0 | | |
| <i>M₃</i> | A ₁ | 0 | 3 | 3 | 2,8660 | 8,2142 |
| | B ₁ | 0 | 7 | 7 | | |
| | A ₂ | 0 | 6 | 6 | | |
| | B ₂ | 0 | 2 | 2 | | |
| <i>M₄</i> | A ₁ | 0 | 0 | 0 | 1,9086 | 3,6428 |
| | B ₁ | 0 | 5 | 5 | | |
| | A ₂ | 0 | 2 | 2 | | |
| | B ₂ | 0 | 3 | 3 | | |
| TOTAL | | 17 | 119 | 136 | 4,844 | 4579,66 |

Realizado por: Ibarra Katherine ,2017



Gráfica 3-3: Recuento de Mohos y Levaduras de la Vertiente del Santuario de “Nuestra Señora de la Fuente del Carmelo” del Barrio Catequilla.

Realizado por: Ibarra Katherine ,2017

En la tabla 4-3 los resultados obtenidos indican la presencia de mohos y levaduras en M₁ y M₂ debido a que este tipo de microorganismos crecen en zonas húmedas y el agua de la vertiente que es transportada mediante tuberías es depositada en un reservorio el cual es un sistema cerrado y por ende se encuentra en condiciones de alta humedad favoreciendo el crecimiento de mohos. Según (Departament of Health and Human Services, 2003) en manantiales existen mohos y levaduras que crecen en condiciones húmedas y cálidas produciéndose mediante esporas llegando a sobrevivir en una gran variedad de condiciones ambientales.

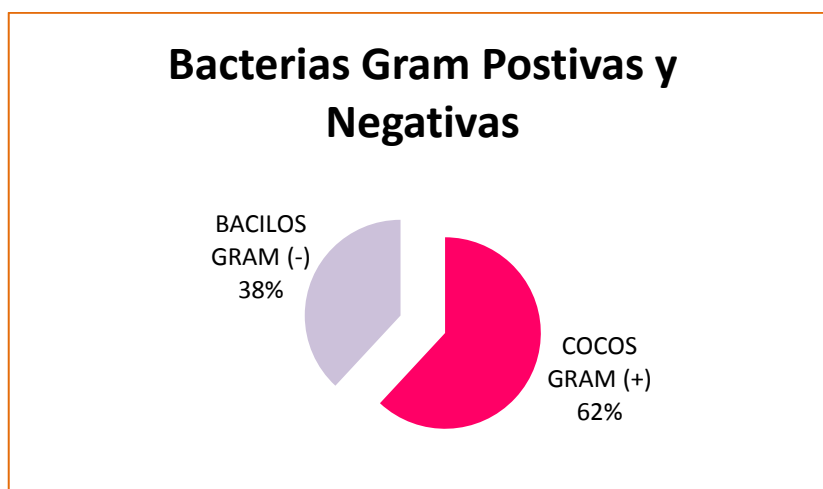
Según la Normativa de la República de Venezuela el recuento de mohos y levaduras no debe sobrepasar las 500 UFC/ mL por lo que los resultados obtenidos se encuentran dentro de los estándares establecidos.

3.3 BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y NEGATIVAS

Tabla 5-3: Recuento de bacterias Gram Positivas y Negativas

| SITIO DE MUESTREO | TINCION GRAM | | |
|----------------------|-------------------|---------------------|------------|
| | COCOS GRAM (+) | BACILOS GRAM (-) | TOTAL |
| M₁ | 10 | 8 | 18 |
| M₂ | 2 | 0 | 2 |
| M₃ | 0 | 0 | 0 |
| M₄ | 1 | 0 | 1 |
| TOTAL | 13 | 8 | 21 |
| PORCENTAJE | 61,9 | 38,09 | 100 |

Realizado por: Ibarra Katherine ,2017



Gráfica 4-3: Porcentaje de Cocos Gram Positivos y Bacterias Gram Negativos

Realizado por: Ibarra Katherine ,2017

En la tabla 6-3 se observa que la mayor parte de los clones aislados en la vertiente corresponde a Cocos Gram Positivos con un 61,90% y con un 38,09% para Bacilos Gram Negativos. Según (FLORES, Sandra. 2013. p. 73) en los análisis realizados en varios manantiales se demostró que la microbiota propia de este tipo de manantiales está constituida principalmente por Cocos Gram positivos. (López, 2000) indica que las aguas de manantial son de excelente calidad microbiológica, física y química no causando ninguna acción específica en el organismo, al ser

de origen subterráneo que emergen espontáneamente en la superficie de la tierra poseen características naturales de pureza que permiten el consumo (López Silva MC,2006),

3.4 DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA DE COLONIAS AISLADAS DE LA VERTIENTE DEL SANTUARIO DE” NUESTRA SEÑORA DE LA FUENTE DEL CARMELO” DEL BARRIO CATEQUILLA.

Tabla 6-3: Descripción Macroscópica de las colonias

| N° Clon | Colonia | Sitio de Muestreo | Toma | Petrifilm | Descripción Macroscópica | Luz Transmitida | Tamaño (mm) |
|---------|---------|-------------------|--------|-----------|--|-----------------|-------------|
| 1 | 6 | M ₁ | Toma 1 | AC | Colonia redonda, pequeña amarillenta cremosa , sin elevación | Translúcido | 0,5 |
| 2 | 11 | M ₁ | Toma 1 | AC | Colonia redonda, pequeña amarillenta cremosa , sin elevación | Translúcido | 0,5 |
| 3 | 13 | M ₁ | Toma 1 | AC | Colonia redonda, pequeña blanca cremosa , sin elevación | Translúcido | 0,5 |
| 4 | 15 | M ₁ | Toma 1 | AC | Colonia redonda, pequeña amarillenta cremosa , sin elevación | Translúcido | 0.5 |
| 5 | 19 | M ₁ | Toma 1 | AC | Colonia redonda, grande amarillenta cremosa , sin elevación | Opaca | 1 |
| 6 | 21 | M ₁ | Toma 1 | AC | Colonia redonda, pequeña amarillenta cremosa , sin elevación | Opaca | 0,5 |
| 7 | 23 | M ₁ | Toma 1 | AC | Colonia redonda, grande amarillenta | Translúcida | 1 |

| | | | | | | | |
|-----------|----|----------------|--------|----|--|-------------|-----|
| | | | | | cremosa , sin elevación | | |
| 8 | 26 | M ₁ | Toma 1 | AC | Colonia redonda , grande amarillenta cremosa , sin elevación | Opaca | 1 |
| 9 | 30 | M ₁ | Toma 1 | AC | Colonia redonda, pequeña amarillenta cremosa , sin elevación | Translúcido | 0.5 |
| 10 | 34 | M ₁ | Toma 1 | AC | Colonia redonda, pequeña amarillenta cremosa , sin elevación | Translúcido | 0.5 |
| 11 | 38 | M ₁ | Toma 1 | AC | Colonia ovalada, pequeña amarillenta cremosa , sin elevación | Translúcido | 0.5 |
| 12 | 41 | M ₁ | Toma 1 | AC | Colonia redonda, grande amarillenta cremosa , sin elevación | Translúcido | 1 |
| 13 | 43 | M ₁ | Toma 1 | AC | Colonia redonda, pequeña amarillenta cremosa , sin elevación | Translúcido | 0.5 |
| 14 | 47 | M ₁ | Toma 1 | AC | Colonia redonda, pequeña amarillenta cremosa , sin elevación | Translúcido | 0.5 |
| 15 | 6 | M ₁ | Toma 1 | SA | Colonia redonda, grande amarillenta cremosa , sin elevación | Opaca | 1 |
| 16 | 11 | M ₄ | Toma 1 | SA | Colonia redonda, pequeña amarillenta cremosa , con elevación | Opaca | 0.5 |
| 17 | 12 | M ₄ | Toma 2 | SA | Colonia redonda, pequeña amarillenta cremosa , sin elevación | Opaca | 0.5 |
| 18 | 8 | M ₁ | Toma 1 | SA | Colonia redonda, pequeña amarillenta cremosa , sin elevación | Translúcido | 0.5 |

| | | | | | | | |
|-----------|----|----------------|--------|----|---|-------------|-----|
| 19 | 13 | M ₂ | Toma 2 | AC | Colonia redonda , grande , blanca cremosa , con elevación | Translúcido | 1 |
| 20 | 35 | M ₂ | Toma 2 | AC | Colonia ovalada , pequeña, blanca cremosa , sin elevación | Translúcido | 0.5 |
| 21 | 41 | M ₁ | Toma 2 | SA | Colonia redonda pequeña , blanca cremosa , sin elevación | Translúcido | 0.5 |

Realizado por: Ibarra Katherine, 2017

En la tabla 6-3 muestra los resultados obtenidos de la descripción macroscópica de los 21 clones aislados, observando la morfología de los clones: 15 colonias pequeñas redondas con un porcentaje del (71.42%), 6 colonias grandes redondas (28,57%), tamaño 0,5mm; además presento 17 de color amarillento cremoso (80,95%) y 4 blancas cremosas (19,04%), 2 colonias con (9,52%) y 19 sin elevación (90,47%); la luz transmitida por estas bacterias 6 opacas (28,57%) y 15 translúcidas (71,42%). Según esta evaluación macroscópica la morfología predominante de los clones aislados de la Vertiente del Santuario “Nuestra Señora de la Fuente del Carmelo” del Barrio Catequilla fueron bacterias redondas pequeñas de 0,5 mm de tamaño de aspecto amarillento cremoso sin elevación y translúcidas.

**3.5 PRUEBAS REALIZADAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE COLONIAS AISLADAS EN LA VERTIENTE DEL SANTUARIO DE”
NUESTRA SEÑORA DE LA FUENTE DEL CARMELO” DEL BARRIO CATEQUILLA.**

Tabla 7-3: Pruebas Bioquímicas

| N° Clon | Sitio de Muestreo | Toma | Petrifilm | Gram | Oxidasa | Catalasa | OF | | Pruebas Bioquímicas | | | | | | E.M.B | Mac. Conkey | S-S | Manitol |
|---------|-------------------|--------|-----------|---------------|---------|----------|------------------|-------|---------------------|-----------------|---------|---------|------|-----------|-------|-------------|-----|---------|
| | | | | | | | | | Cerrado | Abierto | Kliguer | Citrato | Urea | SIM | | | | |
| | | | | | | | H ₂ S | Indol | | | | | | Movilidad | | | | |
| 1 | M ₁ | Toma 1 | AC | Cocos G (+) | - | + | - | - | (+) F.G.L.S.G | - | - | - | - | + | N.A | N.A | N.A | + |
| 2 | M ₁ | Toma 1 | AC | Bacilos G (-) | - | - | - | - | Negativo | - | - | - | - | - | S.C | C | - | N.A |
| 3 | M ₁ | Toma 1 | AC | Bacilos G (-) | - | - | - | - | Negativo | - | - | - | - | - | S.C | C | - | N.A |
| 4 | M ₁ | Toma 1 | AC | Bacilos G (-) | - | - | - | - | (+) F.L.S.G | - | - | - | - | - | S.C | S.C | - | N.A |
| 5 | M ₁ | Toma 1 | AC | Cocos G (+) | - | - | - | - | Negativo | - | - | - | - | - | N.A | N.A | N.A | - |
| 6 | M ₁ | Toma 1 | AC | Bacilos G (-) | - | - | - | - | (+) F.L.S.G | (+) C.A.S.C. | - | - | - | - | S.C | S.C | - | N.A |
| 7 | M ₁ | Toma 1 | AC | Cocos G (+) | - | + | - | - | (+) F.L.S.G | - | + | - | - | + | N.A | N.A | N.A | + |
| 8 | M ₁ | Toma 1 | AC | Cocos G (+) | - | + | - | - | (+) F.L.S.G | - | + | - | - | + | N.A | N.A | N.A | + |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|----------------|--------|----|---------------|---|---|---|---|-------------|-----------------|---|---|---|---|-----|-----|-----|-----|
| 9 | M ₁ | Toma 1 | AC | Bacilos G(-) | - | - | - | - | (+) F.L.S.G | - | - | - | - | + | S.C | S.C | - | N.A |
| 10 | M ₁ | Toma 1 | AC | Cocos G (+) | - | + | - | - | Negativo | (+) C.A.C.C. | - | - | - | - | N.A | N.A | N.A | - |
| 11 | M ₁ | Toma 1 | AC | Cocos G (+) | - | + | - | - | (+) F.L.S.G | - | - | - | - | + | N.A | N.A | N.A | - |
| 12 | M ₁ | Toma 1 | AC | Bacilos G (-) | - | - | - | - | Negativo | - | + | - | - | + | S.C | S.C | - | N.A |
| 13 | M ₁ | Toma 1 | AC | Bacilos G (-) | + | - | - | - | (+) F.L.S.G | - | - | - | - | + | S.C | C | - | N.A |
| 14 | M ₁ | Toma 1 | AC | Cocos G (+) | - | + | - | - | (+) F.G.L | - | - | - | - | + | N.A | N.A | N.A | - |
| 15 | M ₁ | Toma 1 | SA | Cocos G (+) | - | + | - | - | (+) F.L | (+) C.A.C.C | - | - | - | + | N.A | N.A | N.A | - |
| 16 | M ₁ | Toma 1 | SA | Cocos G (+) | - | + | - | - | (+) F.L | - | - | - | - | + | N.A | N.A | N.A | - |
| 17 | M ₄ | Toma 2 | SA | Cocos G (+) | - | + | - | - | Negativo | - | - | - | - | + | N.A | N.A | N.A | - |
| 18 | M ₁ | Toma 1 | SA | Cocos G (+) | - | + | - | - | (+) F.L | - | - | - | - | + | N.A | N.A | N.A | - |
| 19 | M ₂ | Toma 2 | AC | Cocos G (+) | - | + | - | - | Negativo | (+) C.A.C.C. | + | - | - | - | N.A | N.A | N.A | - |
| 20 | M ₂ | Toma 2 | AC | Cocos G (+) | - | + | - | - | (+) F.G.L | - | - | - | - | + | N.A | N.A | N.A | - |
| 21 | M ₁ | Toma 2 | SA | Cocos G (+) | - | + | - | - | (+) F.L | - | | - | - | - | N.A | N.A | N.A | + |

Realizado por: Ibarra Katherine,2017

E.M.B: Eosina Azul de Metileno, **S-S:** Salmonella-Shigella, **SC:** Sin crecimiento, **C:** crecimiento, **N.A:** no aplica **(+):** Positivo , **(-):** Negativo

F.G.L.S.G: Fermenta Glucosa,lactosa sin gas ; **F.L.S.G:** Fermenta lactosa sin gas ; **F.G.L:** Fermenta glucosa y lactosa; **F.I:** Fermenta lactosa ;
C.A.S.C: Color azul sin colonias ; **C.A.C.C:** Color azul con colonias ; **G(+):** Gram positivos ; **G(-):** Gram Negativos

En la tabla 7-3 puede observar 17 de los clones obtenidos pertenecen a la Red de captación, 2 pertenecen a la red de tanque de cloración y 2 a la fuente de bebida.

Para la identificación se realizaron pruebas bioquímicas entre estas esta la prueba de oxidasa que se basa en la identificación de una enzima bacteriana llamada citocromo C oxidasa como lo menciona (Cercenado y Cantón , 2010: p.15) dando como positivo el clon numero 13 (4,76%) el mismo que tiene esta característica siendo este Bacilo Gram negativo. La prueba de catalasa según (Cercenado y Cantón , 2010: p.8) hidroliza el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, indicado el desprendimiento de burbujas como prueba positiva, de los 21 clones aislados 16 (76,19%) tienen esta capacidad. Los bacilos Gram Negativos presentan catalasa, oxidasa positivos y fermentan glucosa, son halodependientes es decir requieren la presencia de cloruro de sodio para su crecimiento .Son comunes de hábitats marinos, en aguas de temperatura de entre 17°C - 20°C, por ello son mas comunes en climas templados. (BARROW, G., & FELTHAM, R. 1993. p. 123)

La prueba de OF determina si las bacterias utilizan los carbohidratos por la vía oxidativa o fermentativa según (Cercenado y Cantón , 2010: p.19) indicando que de los 21 clones dio la pruebas negativa tanto en el sistema abierto como cerrado .La utilización de carbohidratos proveniente de las bacterias puede ser fermentativa como en el caso de bacterias anaerobias, las bacterias facultativas pueden fermentar en ausencia de oxígeno, mientras que las aerobias estrictas pueden degradar carbohidratos únicamente mediante metabolismo oxidativo en presencia de aceptores inorgánicos de electrones. (RODRIGUEZ,Evelyn., et al . 2005)

3.6 . BACTERIAS IDENTIFICADAS POR PRUEBAS BIOQUÍMICAS

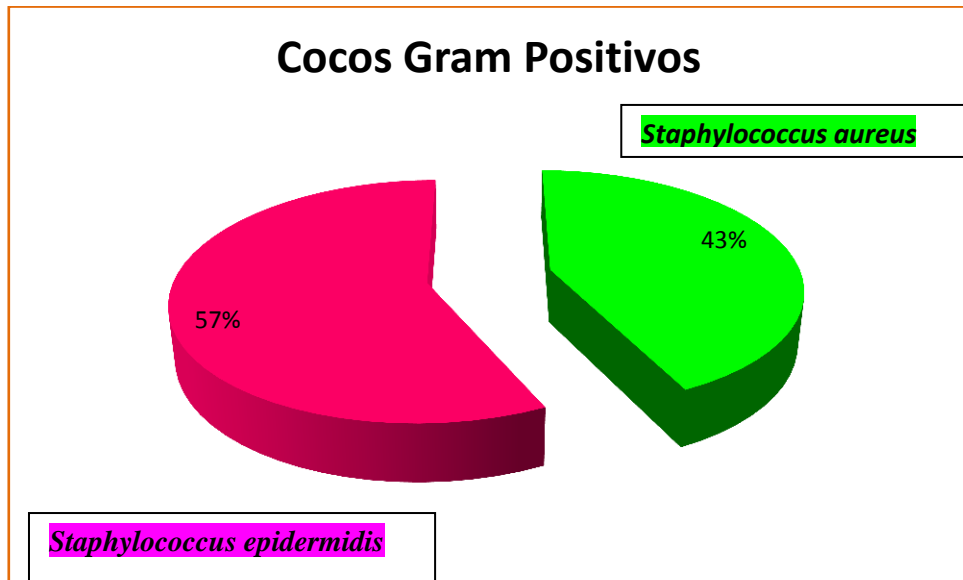
Tabla 8-3: Bacterias Inidentificadas Cocos Gram Positivos

| N° Clon | Sitio de Muestreo | Petrifilm | Especie Identificada | Porcentaje |
|-----------------|-------------------|-----------|-----------------------------------|------------|
| C ₁ | M ₁ | AC | <i>Staphylococcus aureus</i> | 80% |
| C ₅ | M ₁ | AC | <i>Staphylococcus aureus</i> | 70% |
| C ₇ | M ₁ | AC | <i>Staphylococcus aureus</i> | 70% |
| C ₈ | M ₁ | AC | <i>Staphylococcus aureus</i> | 60% |
| C ₁₀ | M ₁ | AC | <i>Staphylococcus aureus</i> | 80% |
| C ₁₁ | M ₁ | AC | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 80% |
| C ₁₄ | M ₁ | AC | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 70% |
| C ₁₅ | M ₁ | SA | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 60% |
| C ₁₆ | M ₁ | SA | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 70% |
| C ₁₇ | M ₁ | SA | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 50% |
| C ₁₈ | M ₁ | SA | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 70% |
| C ₁₉ | M ₂ | AC | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 60% |
| C ₂₀ | M ₂ | AC | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 70% |
| C ₂₁ | M ₁ | SA | <i>Staphylococcus aureus</i> | 80% |

Realizado por: Ibarra Katherine ,2017

En la tabla 8-3 se muestra las especies identificadas mediante la realización de pruebas bioquímicas, en el caso de *Staphylococcus aureus* la identificación se realizó con un rango de certeza entre 70% al 80 % cumpliendo con la mayoría de pruebas para ser identificadas como bacterias de este género .Dentro de las pruebas confirmatorias tenemos manitol (+), catalasa (+), oxidasa (-), kliguer (+), manitol (+) y la más importante la pigmentación que aporta un color

amarillento cremoso debido a los carotenoides característicos de esta bacteria; mientras que la bacteria *Staphylococcus epidermidis* se encuentra en un rango de 50% al 70% cumpliendo con el porcentaje aceptable para la identificación de esta bacteria cumpliendo con la prueba de catalasa dando como resultado (+), manitol (-), ureasa (+) y kliguer (+).(MacFaddín, 2013)



Gráfica 5-3: Bacterias Identificadas Cocos Gram positivos

Realizado por: Ibarra Katherine, 2017

El gráfico 5-3 muestra la proporción de clones que se aislaron pertenecientes a Cocos Gram positivos de los cuales los clones 1,5,7,8,10 y 21 corresponden a *Staphylococcus aureus*. Según (Zendejas Manzo,2014) presentan catalasa positiva, caracterizándose por su pigmentación amarillenta debido a la producción de carotenoides que puede ser favorecida si se incuba a temperatura ambiente y luz natural durante 24 horas, dichas características coinciden con los datos obtenidos en las pruebas bioquímicas realizadas. Según (Margarita Aurazo de Zumaeta,2011) los organismos propios de las aguas subterráneas están en permanente actividad y ninguno vive aislado de tal manera que depende del medio que los rodea, permitiendo que estos organismos desarrollen los ciclos biológicos y químicos en el cuerpo del agua demostrando que no todas las bacterias patógenas que se transmiten en el agua tienen igual significado para la salud por lo que se denominan bacterias patógenas oportunistas.

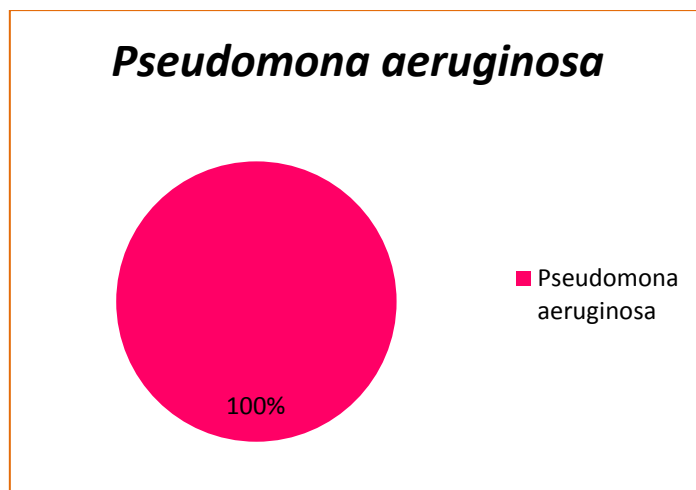
Los clones 11,14,15,16,17,18,19 y 20 corresponden a *Staphylococcus epidermidis*. Según (Zendejas Manzo,2014) son cocos gram positivos Esta especie, al ser flora normal de piel, podrían ser introducidas en la muestra en el momento de la recolección.

Tabla 9-3: Bacterias Inidentificadas Bacilos Gram Negativos

| N° Clon | Sitio de Muestreo | Petrifilm | Especie Identificada | Porcentaje |
|-----------------|-------------------|-----------|------------------------------|------------|
| C ₂ | M ₁ | AC | <i>Pseudomona aeruginosa</i> | 70% |
| C ₃ | M ₁ | AC | <i>Pseudomona aeruginosa</i> | 60% |
| C ₄ | M ₁ | AC | <i>Pseudomona aeruginosa</i> | 60% |
| C ₆ | M ₁ | AC | <i>Pseudomona aeruginosa</i> | 70% |
| C ₉ | M ₁ | AC | <i>Pseudomona aeruginosa</i> | 70% |
| C ₁₂ | M ₁ | AC | <i>Pseudomona aeruginosa</i> | 85% |
| C ₁₃ | M ₁ | AC | <i>Pseudomona aeruginosa</i> | 70% |

Realizado por: Ibarra Katherine, 2017

En la tabla 9-3 se muestra el resultado obtenido para las bacterias Gram Negativas aisladas e identificadas todas pertenecientes a la especie *Pseudomona aeruginosa* encontrándose en un rango de 70% -80% ,dando su confirmación de esta especie mediante pruebas bioquímicas como catalasa (+), oxidas (+), Movilidad (+), indol (-), ureasa (+) y kliger (+) según (Álvarez, E.BOQUET)



Gráfica 6-3: Bacterias Identificadas Bacterias Gram Negativas

Realizado por: Ibarra Katherine, 2017

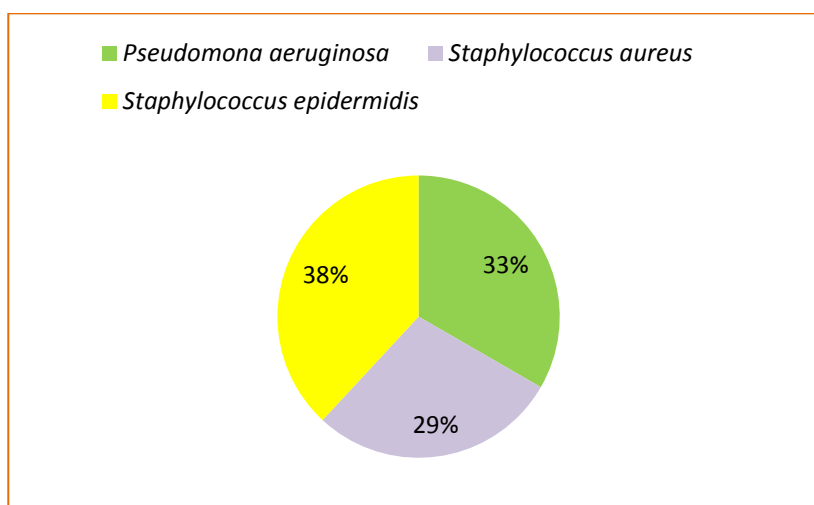
Los resultados obtenidos y mostrados en el gráfico 6-3 indican que los clones aislados pertenecen a la familia *Pseudomonaceae*, grupo de bacterias Gram negativas aerobias, en metabolismo no oxidativo, siendo la principal especie que se encuentra repartida en el suelo, agua y de ahí contaminan a plantas y animales, produciéndose en lugares húmedos de acuerdo (KONEMAN, et al, 2008, p.3). El agua de vertiente es uno de los hábitats en donde se encuentra la bacteria *Pseudomona aeruginosa*, siendo estimulada por la contaminación proveniente de los pozos ciegos, teniendo en cuenta que es una bacteria que naturalmente se encuentra en el suelo por lo que puede filtrarse hacia el acuífero donde obtiene los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano (Valiente y González,2002).

3.6.1 Análisis de las bacterias identificadas en la Vertiente del Santuario de “Nuestra Señora de la Fuente del Carmelo”.

Tabla 10-3: Análisis de las bacterias identificadas en la Vertiente del Santuario de “Nuestra Señora de la Fuente del Carmelo”.

| GÉNERO | ESPECIE |
|-----------------------|--------------------|
| <i>Pseudomona</i> | <i>aeruginosa</i> |
| <i>Staphylococcus</i> | <i>aureus</i> |
| <i>Staphylococcus</i> | <i>epidermidis</i> |

Realizado por: Ibarra Katherine ,2017



Gráfica 7-3: Bacterias Identificadas

Realizado por: Ibarra Katherine, 2017

En la tabla 10-3 se indica el género y la especie de las bacterias identificadas en los sitios de muestreo. Según (Merino et al, 1998) el agua natural contiene muy pocos microorganismos debido a la escasez de nutrientes en este medio, sin embargo es frecuente que algún tipo de microorganismo patógeno se encuentre como consecuencia de la perturbación que ocasiona el sistema hidrogeológico.

En la Vertiente del Santuario de “Nuestra Señora de la Fuente del Carmelo” se identificó a las bacterias *Pseudomona aeruginosa* 33%, *Staphylococcus aureus* 29% y *Staphylococcus epidermidis* 35%.

- ***Pseudomona aeruginosa:*** Se trata de un microorganismo que se encuentra fácilmente en el suelo y se comporta como desnitrificante desempeñando un papel importante en el ciclo del nitrógeno en la naturaleza .Soares indica la importancia de la *Pseudomonas* estableciendo la

capacidad que tiene de inhibir los coliformes debido a que producen una sustancia denominada Pseudocin que inhibe el crecimiento de *E.coli* lo cual produciría la disminución de este indicador. (Drenkard, 2003) establece que esta bacteria no representa una fuente de infección importante.

▪

La presencia de *Pseudomona aeruginosa* en el agua de la Vertiente del Santuario de “Nuestra Señora de la Fuente del Carmelo” puede deberse a que esta bacteria es común en el suelo y siendo este un pozo artesiano el agua sale a la superficie de manera natural entrando en contacto con el suelo según (ARCOS; et al, 2005, p.74).

- ***Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*:** Al género *Staphylococcus* se lo conoce como organismos ubicuos y se pueden encontrar en el agua, aire, polvo y en una variedad de productos alimenticios. El microorganismo *S.aureus* forma comúnmente parte de la microflora humana y puede producir enfermedades gastrointestinales y respiratorias encontrándose principalmente en las superficies de las mucosas debido a la existencia de una enterotoxina estafilocócica termoestable manifestándose mediante síntomas como fiebre, vómito, diarrea según (SEIJA, 2008, p. 257).

3.7 ANTIBIOGRAMA

3.7.1 *Análisis de Antibiogramas de Clones Bacterias Gram Negativos*

Tabla 11-3: Antibiograma de los Clones Bacterias Gram Negativos de la vertiente del Santuario de “Nuestra Señora de la Fuente del Carmelo”.

| CLON | ANTIBIOTICOS | | | | | | | | | |
|-----------------|------------------------------|----------------|------------|------------|--------------|--------------|-----------------|-----------------------------|-------------|-----------------------------|
| | BACTERIA | Ciprofloxacino | Ampicilina | Kanamicina | Eritromicina | Tetraciclina | Nitrofurantoina | Trimetoprima/Sulfametoxazol | Gentamicina | Amoxicilina/Ac.Cla vulánico |
| C ₂ | <i>Pseudomona aeruginosa</i> | S | R | S | S | S | R | S | S | S |
| C ₃ | <i>Pseudomona aeruginosa</i> | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| C ₄ | <i>Pseudomona aeruginosa</i> | S | R | S | S | S | S | S | S | S |
| C ₉ | <i>Pseudomona aeruginosa</i> | S | R | S | S | S | R | S | S | S |
| C ₁₂ | <i>Pseudomona aeruginosa</i> | S | R | S | S | S | R | S | S | S |
| C ₁₃ | <i>Pseudomona aeruginosa</i> | S | S | S | S | R | R | R | S | R |

Realizado por: Ibarra Katherine, 2017

S: sensible; R: resistente

En la tabla 11-3 se observa el resultado de los antibiogramas realizados a los clones de bacilos Gram negativos y siendo C₃ *Pseudomona aeruginosa* el clon que presentó sensibilidad a todo antibiótico utilizado; mientras que el clon 2,9 y 12 presentan resistencia a los antibióticos ampicilina y nitrofurantoina y el clon 13 presentó multiresistencia a los antibióticos tetraciclina, nitrofurantoina, Trimetoprima/Sulfametoxazol y Amoxicilina/Ac.Clavulánico.

Según el manual en resistencia bacteriana y normas CLSI M100-S20.2010 (GREBO, 2010) este microorganismo es resistente a las penicilinas cefalosporinas de primera y segunda generación y Trimetoprima sulfametoxazole.

(García, et al. 2014) menciona que el tratamiento para infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* mediante antibióticos en algunos casos es difícil, debido a que esta bacteria posee plásmidos de multiresistencia que conlleva a la aparición de cepas multiresistentes, generando un problema al momento de proporcionar un tratamiento eficaz contra las infecciones causadas por esta bacteria.

Tabla 12--3: Antibiograma de los Clones Cocos Gram Positivos de la vertiente del Santuario de “Nuestra Señora de la Fuente del Carmelo”.

| #CLON | ANTIBIOTICOS | | | | | | | | | |
|-----------------|-----------------------------------|-------------|-----------|-------------|----------------|------------|--------------|------------|-------------|---------------------------------|
| | BACTERIA | Gentamicina | Amikacina | Ceftriaxona | Ciproflaxacino | Penicilina | Tetraciclina | Ampicilina | Vancomicina | Amoxicilina/Ac. Clavu lánico |
| C ₁ | <i>Staphylococcus aureus</i> | R | R | R | S | R | R | S | S | S |
| C ₅ | <i>Staphylococcus aureus</i> | S | S | S | S | R | S | R | S | S |
| C ₇ | <i>Staphylococcus aureus</i> | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| C ₈ | <i>Staphylococcus aureus</i> | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| C ₁₀ | <i>Staphylococcus aureus</i> | S | S | S | S | R | S | R | S | S |
| C ₁₁ | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | S | S | S | S | R | S | R | S | S |
| C ₁₄ | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | S | S | S | S | R | S | R | S | S |
| C ₁₅ | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | S | S | S | S | R | S | R | S | R |
| C ₁₆ | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | S | S | S | S | R | S | R | S | R |
| C ₁₇ | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | S | S | S | S | R | S | S | S | S |
| C ₁₈ | <i>Staphylococcus</i> | S | S | S | S | R | S | R | S | S |

| | | | | | | | | | | |
|-----------------|-----------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | <i>epidermidis</i> | | | | | | | | | |
| C ₁₉ | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| C ₂₀ | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | S | S | S | S | R | S | R | S | R |
| C ₂₁ | <i>Staphylococcus aureus</i> | S | S | S | S | R | S | S | S | R |

Realizado por: Ibarra Katherine, 2017

S: sensible; R: resistente

En la tabla 12-3 se muestran los antibiogramas de los clones cocos Gram positivos, observándose que el clon 1 se a identificado como *Staphylococcus aureus* presentó resistencia a los antibióticos gentamicina, amikacina, ceftriaxona, penicilina y tetraciclina, lo que indica que esta bacteria es multiresistente , mientras que los clones 7,8 y 19 fueron sensibles a todos los antibióticos utilizados dando una posibilidad de éxito terapéutico. (GREBO, 2010)

En la misma tabla se puede observar que la mayoría de los clones son resistentes a los antibióticos penicilina y ampicilina debido a la producción de β -lactamasas que de acuerdo a (Cuadrado D.et, al.2007) actualmente, de 70 a 80% de los *S. aureus* aislados son resistentes debido a la contaminación ambiental dada por metales pesados

CONCLUSIONES

- Los valores de temperatura (15,8°C) y pH (7) obtenidos muestran que la fuente posee una agua neutra clasificada como fría.
- La evaluación microbiológica (coliformes totales y fecales /*E.coli*, mohos y levaduras, *Staphylococcus*, *Aerobios mesófilos*) mostraron un bajo crecimiento.
- Se aislaron un total de 21 colonias bacterianas, de las cuales un 38,09% corresponden a Bacterias Gram negativas y un 61,90% a Cocos Gram Positivos.
- Todos los clones aislados ubicándose en 3 tipos de bacterias diferentes, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* bacilos Gram Positivos y una especie Gram Negativa *Pseudomona aeruginosa*.
- La evaluación de la resistencia a antibióticos de los clones aislados mostró un comportamiento que va desde la sensibilidad a todos los antibióticos utilizados clon 1 de *Staphylococcus aureus* hasta la resistencia múltiple a los antibióticos gentamicina, Amikacina, Ceftriaxona, penicilina debido a la producción de la enzima B-lactamasa del grupo de los B-Lactámicos.
- Dentro de las especies Gram Negativas identificadas las bacterias presentaron resistencias a los antibióticos ampicilina y nitrofurantoina, en los clones 2,9 y 12, en el caso del clon 3 presentó sensibilidad a todos los antibióticos y el clon 13 indicó multiresistencia a los antibióticos: tetraciclina, nitrofurantoina, Trimetoprima/Sulfametoxazol y Amoxicilina/Ac.Clavulánico.
- Los resultados obtenidos en este trabajo indican que desde el punto de vista microbiológico el agua de la Vertiente del Santuario “Nuestra Señora del Carmelo” posee una baja carga microbiana muy por debajo de los valores máximos establecidos, lo cual la hacen utilizable para el consumo humano.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar una evaluación de los contaminantes presentes en la fuente .
- Se recomienda al GAD del Cantón Chambo en conjunto con el laboratorio de análisis de agua siga llevando el buen funcionamiento de esta vertiente como lo están haciendo debido a que esta agua presenta buena calidad y es apta para el consumo humano.
- En vista que Ecuador es un país tiene una diversidad ecológica magnífica y rico en manantiales, se debería investigar sitios en donde se encuentran subterráneos para poder disfrutar y conocer de estas fuentes que nos proporcionan vida y energía .
- Es necesario realizar evaluaciones de la fuente, en diferentes épocas del año, para determinar cómo varía la carga microbiana de la fuente.

BIBLIOGRAFIA

3M. Petrifilm™. Guía de interpretación. Durán-Ecuador .2003. p80.

ANDUEZA, Félix. Microbiología del agua . Facultad de Farmacia y Bioanálisis . Mérida – Venezuela . Universidad de los Andes Mérida .2014.p 9

ÁLVAREZ,María., & BOQUET, Ernesto. Manual de Técnicas en Microbiología Clínica . 2ª ed. Madrid-España. Garsi. 1990. pp.29-39, 111-144

ANTONIO, J. & NIETO, S. *bacteriana en el laboratorio de microbiología.* Fundamentos y técnicas de análisis microbiológicos. Morfología y estructura bacteriana. , pp. 1-9.

APELLA, M. & ARAUJO, P., Microbiología del agua. Conceptos básicos. *Tecnologías Solares para la Desinfección y Descontaminación del Agua*, 2005. pp. 33-50.

ARCOS, Mireya., et al. Indicadores microbiológicos de contaminación de las fuentes de agua. *NOVA* vol. 3. 2005 pp. 69-79. [Consulta: 2017-04-13]
http://www.unicolmayor.edu.co/invest_nova/NOVA/ARTREVIS2_4.pdf.

BARRENECHEA, A., Aspectos físicoquímicos de la calidad del agua. *Tratamiento de agua para consumo humano. Plantas de filtración rápida. Manual I: teoría.* (2004) [en línea], vol. 1, pp. 2-56. <http://www.bvsde.paho.org/bvsatr/fulltext/tratamiento/manualI/tomoI/uno.pdf>.

BREU F, S. & WOLLMANN, JC.(2008). Análisis de aguas. *Vasa* [en línea], pp. 46.
Disponible en: <http://medcontent.metapress.com/index/A65RM03P4874243N.pdf>.

BURBANO, Napoleón., et al. Aguas Termominerales en el Ecuador. Quito- Ecuador. INAMHI. 2013. pp. 5-13, 40-4

BD. Salmonella Shiguella Agar. 2013. pp2-4. [en línea] <http://www.bd.com/resource.aspx?id=8779>

GOBIERNO AUTÓNOMO DESCENTRALIZADO MUNICIPAL DEL CANTÓN CHAMBO.
Asociación de municipalidades Ecuatorianas . Chimborazo –Ecuador.2012

CANTÓN, R., et. al. Lectura interpretada del antibiograma : una necesidad clí. *Elsevier*, vol. 28, no. 6, (2004). pp. 375-385.

CARBAJAL ,A & GONZALES ,M., et . al. Propiedades físicas y químicas del agua. *Agua*, 2013. pp. 1-16. <https://www.ucm.es/.../458-2013-07-24-Carbajal-Gonzalez-2012-ISBN-9>.

DE LA ROSA, María., & MOSSO,María. Diversidad Microbiana de las aguas Minerales Termales. Panorama actual de las aguas minerales y minero-medicinales en España. Instituto Tecnológico Geominero de España 2000. pp. 153-157

COMUNIDAD ANDINA.,. Presentación. [En línea] 2010 [Consulta: 2017/04/15]]
http://www.comunidadandina.org/Upload/2011225165237AGUA_DE_LOS_ANDES.pdf.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. *M100-S24* Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. *Twenty-Fourth Informational Supplement*. Vol.34(1).2014. Estados Unidos . pp. 11-18

E.M.B., E . M . B . Agar (con Eosina y Azul) [En línea] http://www.britanialab.com/productos/229_hoja_tecnica_es.pdf.

FAGUNDO, J.R., CIMA, A. & GONZÁLEZ, P., et al.. Revisión bibliográfica sobre clasificación de las aguas minerales y mineromedicinales. , pp. 27.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION / ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (FAO/OMS). Norma Codex para las aguas minerales .Codex Standard 108-1981-Enmienda 201. 2008. pp.1

FÉLEZ SANTAFÉ M., El agua. *Revista de la facultad de ciencias básicas*, 1987 pp. 4211.

GARCIAL, Leisy., & IANNACONE, José. Artículo de Revisión . *Aeuroginosa P.* pp. 133-152

GUÍA. Interpretación 3M Petrifilm. Recuento de E.coli/Coliformes. [En línea] 2017 [Consulta 10 de Abril del 2017] Disponible en: http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat/workshopmrama/files/Petrifilm_guias.pdf

GREBO. Secretaria manual de actualizacion en resistencia bacteriana y normas CLSI M100 -S20. 2010. pp. 1-78.

HIGH LEIFSON O.F. Oxidación-fermentación (prueba de hugh y leifson)

2011 Disponible en: http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/leifson.pdf.

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGÍA E HIDROLOGÍA (INAMHI). Instituto Nacional de Meteorología e Hidrologia .Aguas Termominerales en el Ecuador. Quito-Ecuador . Inamhi . 2013. P.205

KONEMAN , Elmer., & ALLEN ,Stephen. Diagnostico Microbiologico. 6^a ed.Madrid - España.Editorial Médica Panamericana . 2006. p.264

LÓPEZ, Tévez., & TORRES, Leonor. Medios de Cultivos Microbiologia. *Universidad Nacional de Nordeste. Facultad de Agroindustrias.Microbiologia.* 2010. vol. 1, pp. 15-20.

MACFADDIN, Jean. Pruebas bioquimicas para la identificación de bacterias de Importancia Clinica, 3^a ed. Montevideo-Uruguay. Editoril Médica Panamericana. 2000. Pp.723-733.

MADIGAN, Michael., et al. Biología de los Microorganismos . 8^a ed. Madrid-España. Prentice Hall. 1998. Pp.162-981.

OBÓN, J. Análisis Microbiológico del agua .2010. pp 29.

PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO: Ortega & Garibaldi. 2009. Universidad Técnica Nacional. Disponible en: [http://www.frro.utn.edu.ar/repositorio/catedras /quimica/5_anio/biotecnologia /practicoI.pdf](http://www.frro.utn.edu.ar/repositorio/catedras/quimica/5_anio/biotecnologia/practicoI.pdf).

PRATS, G., (2006). Microbiología Clínica. , no. factor X, pp. 366.

RECUESTO DE MOHOS Y LEVADURAS. GUÍA DE INTERPRETACIÓN PETRIFILM™. Microbiology Products Laboratoires 3M. 2009. [http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat.workshopmrama/files/Petrifilm_guias.pdf](http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat/workshopmrama/files/Petrifilm_guias.pdf). Fecha de consulta: 2017/04/08.

RECUESTO DE AEROBIOS. GUÍA DE INTERPRETACIÓN PETRIFILM™. Microbiology Products Laboratoires 3M. 2009. http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat.workshopmrama/files/Petrifilm_guias.pdf . Fecha de consulta : 2017/04/08.

SEVERICHE, Carlos, et al. *Calidad del agua para consumo humano, municipio de Turbaco Bolívar.* Turbaco-Colombia: GISAH,2015.<http://www.eumed.net/libros-gratis/2015/1459/1459.zip>

SIERRA, Carlos. *Calidad del agua, evaluación y diagnóstico.* Universidad de Medellín. Medellín-Colombia 2011.

<http://es.slideshare.net/vladyvostok/calidad-del-agua-evaluación-y-diagnostico>

SISTEMA DE RECUESTO STAPH EXPRESS. GUÍA DE INTERPRETACIÓN PETRIFILM™. Microbiology Products Laboratoires 3M. 2009. http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat.workshopmrama/files/Petrifilm_guias.pdf

TORTORA, G., et al. Crecimiento Microbiano. Introducción a la microbiología, Panamá. Médica Panamericana. 2007. Pp. 159 -160

TORRES, P& CRUZ, C., et al. *Índices de calidad de agua en las fuentes superficiales utilizadas en la producción de agua para consumo humano.* Revistas de Ingeniería .Universidad de Medellín. 2009. pp79-94. <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4>

VENDERELL,M., et al. Estudios de Microorganismos patógenos en la fuente termal de O Tinteiro en Ourense. Ciencia Y Tecnología alimentaria. Vol.2(2). México D.F. pp92-95

VIBRIOS DE ORIGEN MARINO EN PATOLOGIA HUMANA . Gutierrez &Garcia . 1993.

Disponible : <http://www.revistaaquatic.com/aquatic/art.asp?c=22>

ANEXOS

ANEXO A : *Vertiente de Catequilla*



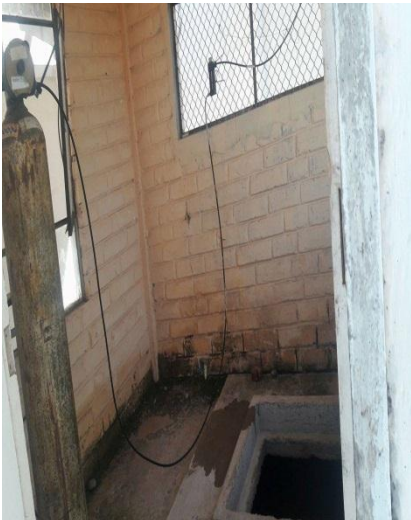
Realizado por: Ibarra Katherine ,2017

ANEXO B: *Ojo de vertiente –fuente de bebida*



Realizado por: Ibarra Katherine ,2017

ANEXO C: Red de Cloración



Realizado por: Ibarra Katherine ,2017

ANEXO D: Red de Distribución



Realizado por: Ibarra Katherine ,2017

ANEXO E: Medición de parámetros físico químicos



Realizado por: Ibarra Katherine ,2017

ANEXO F: Resultados de tomas de muestra



Realizado por: Ibarra Katherine ,2017

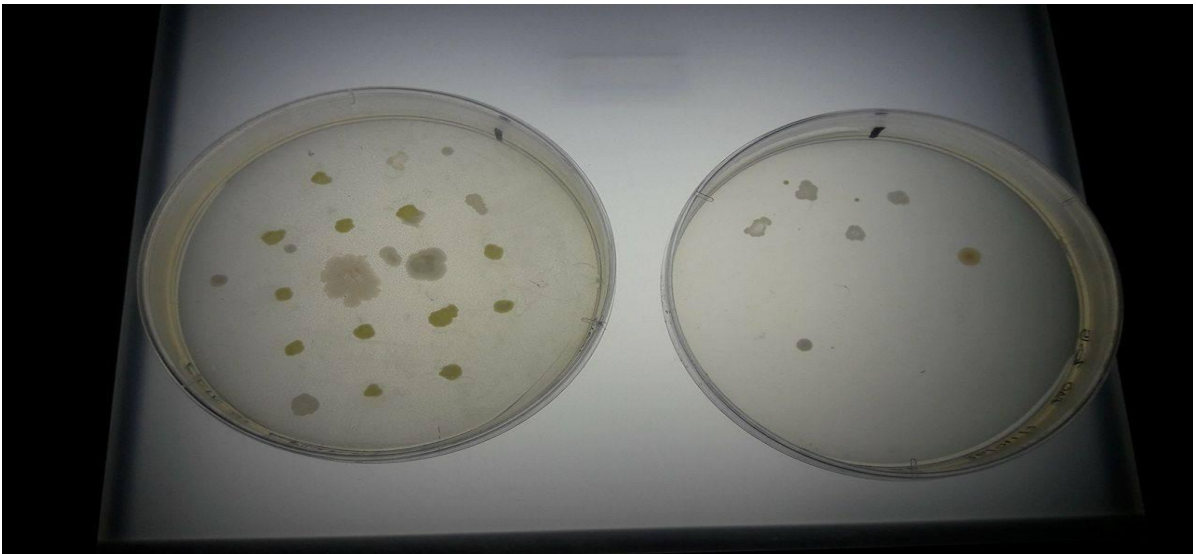


Realizado por: Ibarra Katherine ,2017



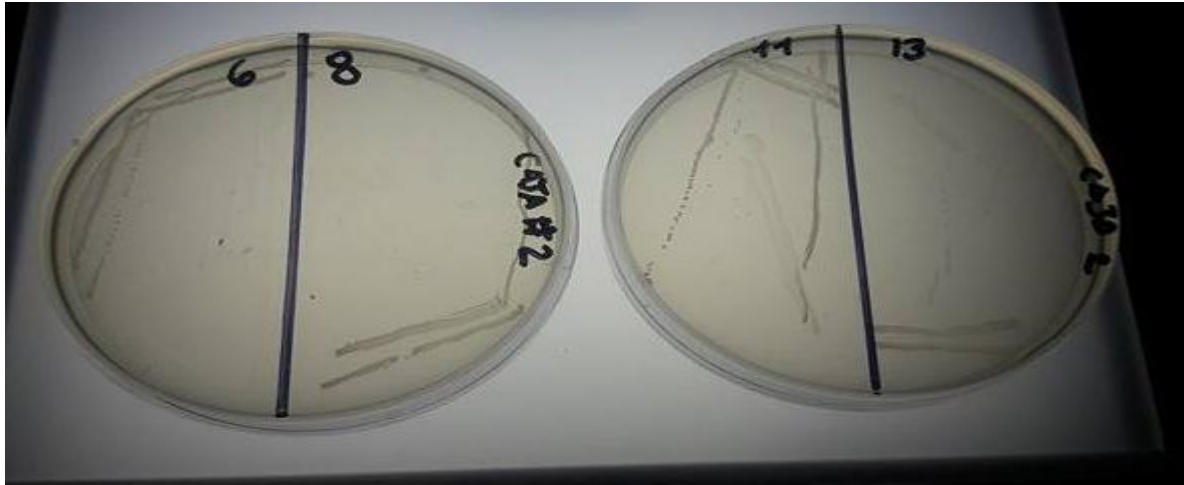
Realizado por: Ibarra Katherine ,2017

ANEXO G: Repiques de las colonias en agar Mueller Hinton



Realizado por: Ibarra Katherine ,2017

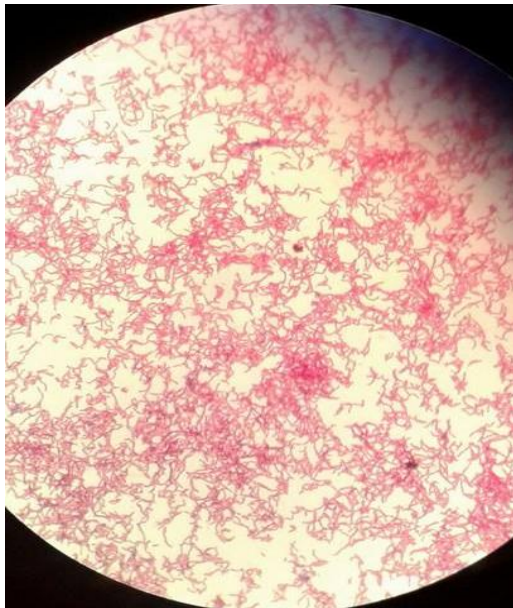
ANEXO H: Siembra en estriamiento en colonias aisladas



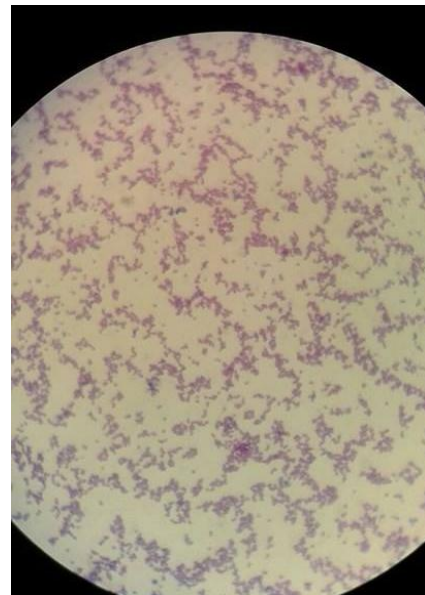
Realizado por: Ibarra Katherine ,2017

ANEXO I: Resultados de la Tinción Gram

Gram Positivos



Gram Negativos



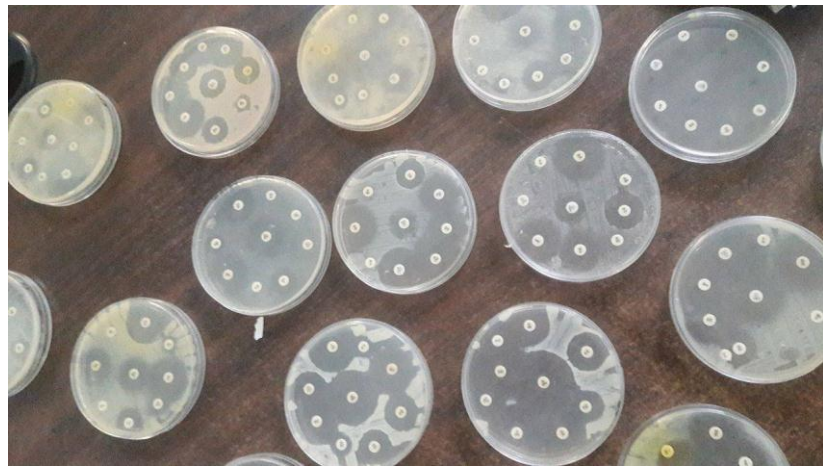
Realizado por: Ibarra Katherine ,2017

ANEXO J: Pruebas Bioquímicas



Realizado por: Ibarra Katherine ,2017

ANEXO K: *Antibiograma*



Realizado por: Ibarra Katherine ,2017