



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LAS AGUAS DEL PARQUE
DE LAS FUENTES DEL CANTÓN GUANO, PERTENECIENTE A
LA PROVINCIA DE CHIMBORAZO”**

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

BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

AUTORA: ADRIANA BELÉN ALMENDARIZ GONZÁLEZ

TUTOR: Dr. GERARDO EMILIO MEDINA RAMIREZ

RIOBAMBA - ECUADOR

2017

©2017, Adriana Belén Almendariz González

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

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

El tribunal de Trabajo de Titulación certifica que: El trabajo de investigación: “ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LAS AGUAS DEL PARQUE DE LAS FUENTES DEL CANTÓN GUANO, PERTENECIENTE A LA PROVINCIA CHIMBORAZO” de responsabilidad de la señorita Adriana Belén Almendariz González, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Titulación, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Dr. Gerardo Medina

DIRECTOR

.....

.....

Dra. Sandra Escobar

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

.....

.....

Yo, Adriana Belén Almendariz González, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en este Trabajo de Titulación y el patrimonio intelectual del Trabajo de Titulación, pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

ADRIANA BELÉN ALMENDARIZ GONZÁLEZ

DEDICATORIA

El presente trabajo va dedicado con todo mi amor y fe a Dios por ser la luz que guía mi camino, por haberme dado las fuerzas necesarias para no rendirme y culminar mi carrera exitosamente.

A mis padres, Marco y Mercedes por brindarme su amor incondicional, su comprensión, sabio consejo, y apoyarme de manera incondicional a lo largo de toda mi vida.

A mis hermanas Emilia y Amira, por ser mis amigas incondicionales y brindarme su apoyo.

A mi abuelita Julia por ser mi ángel que me cuida desde el cielo

Adriana.

AGRADECIMIENTO

A Dios por estar junto a mí en todo momento, llenándome de fuerzas para seguir adelante y darme la oportunidad de culminar una meta más en mi vida.

A mis padres y hermanas por apoyarme y amarme incondicionalmente. Por estar siempre a mi lado dándome ánimos y ayudándome a cumplir esta meta importante en mi vida.

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

Al Dr. Gerardo Medina director del trabajo de titulación y a la Dra. Sandra Escobar miembro del tribunal, por su valiosa colaboración, gracias a ustedes por el apoyo incondicional, paciencia, ayuda, esfuerzo, conocimiento y tiempo que han empleado para que el presente trabajo tenga buenos frutos.

A mis amigos y demás familiares por su amistad y apoyo que me transmitieron durante la elaboración de la presente investigación.

Muchas gracias a todos.

Adriana.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|---|-----------|
| ÍNDICE DE TABLAS..... | i |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | ii |
| ÍNDICE DE IMÁGENES..... | iii |
| ÍNDICE DE GRÁFICAS..... | iv |
| ÍNDICE DE ANEXOS..... | v |
| RESUMEN..... | vi |
| SUMARY..... | vii |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| CAPITULO I | |
| 1. MARCO TEÓRICO | 3 |
| 1.1 Agua..... | 3 |
| <i>1.1.1 Definición y características.....</i> | <i>3</i> |
| <i>1.1.2 Tipos de agua.....</i> | <i>4</i> |
| 1.2 Microbiología del agua | 4 |
| <i>1.2.1 Microbiología.....</i> | <i>4</i> |
| <i>1.2.2 Microorganismos.....</i> | <i>5</i> |
| <i>1.2.3 Morfología bacteriana.....</i> | <i>6</i> |
| <i>1.2.4 Crecimiento microbiano.....</i> | <i>6</i> |
| 1.3 Nutrición Bacteriana..... | 6 |
| 1.4 Medios de cultivo..... | 7 |
| <i>1.4.1 Tipos de Medios de Cultivo.....</i> | <i>8</i> |
| <i>1.4.2 AGAR EMB (agar con eosina y azul de metileno).....</i> | <i>13</i> |
| <i>1.4.3 Agar Mueller Hinton.....</i> | <i>13</i> |
| <i>1.4.4 Agar MacConkey.....</i> | <i>13</i> |

| | | |
|--------|--|----|
| 1.4.5 | <i>Agar Manitol Salado</i> | 13 |
| 1.4.6 | <i>Agar de Citrato de Simmons</i> | 13 |
| 1.4.7 | <i>Agar Salmonella Shigella</i> | 13 |
| 1.4.8 | <i>Agar Hugh Leifson</i> | 14 |
| 1.4.9 | <i>Agar Kligler</i> | 14 |
| 1.4.10 | <i>Agar SIM</i> | 14 |
| 1.4.11 | <i>Agar Urea</i> | 14 |
| 1.4.12 | <i>Agar Citrato Simons</i> | 15 |
| 1.5 | Identificación de microorganismos | 15 |
| 1.5.1 | <i>Inoculación y aislamiento de bacterias</i> | 15 |
| 1.5.2 | <i>Repiques</i> | 15 |
| 1.5.3 | <i>Cultivo puro de bacterias</i> | 16 |
| 1.5.4 | <i>Preparación y tinción de las muestras</i> | 16 |
| 1.6 | Pruebas Bioquímicas | 16 |
| 1.6.1 | <i>Pruebas bioquímicas de lectura rápida</i> | 16 |
| 1.6.2 | <i>Pruebas bioquímicas de lectura lenta</i> | 17 |
| 1.7 | Resistencia Bacteriana a los Antibióticos | 22 |
| 1.7.1 | <i>Antibióticos</i> | 22 |
| 1.7.2 | <i>Mecanismo de resistencia</i> | 22 |
| 1.7.3 | <i>Resistencia antimicrobiana</i> | 22 |
| 1.8 | Parque de las Fuentes | 24 |

CAPITULO II

| | | |
|-----|-------------------------------------|----|
| 2. | METODOLOGÍA | 26 |
| 2.1 | Parte Experimental | 26 |
| 2.2 | Lugar de Muestreo | 26 |
| 2.3 | Factores de Estudio | 27 |
| 2.4 | Localización del lugar | 27 |
| 2.5 | Materiales | 28 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 2.2 | Métodos..... | 29 |
| 2.2.1 | <i>Muestreo.....</i> | 29 |
| 2.2.2 | <i>Toma de la muestra.....</i> | 30 |
| 2.2.3 | <i>Análisis Físico – Químico.....</i> | 30 |
| 2.2.4 | <i>Conservación y transporte de las muestras.....</i> | 30 |
| 2.2.5 | <i>Análisis Microbiológico.....</i> | 30 |
| 2.2.6 | <i>Preparación y repiques en agar Mueller Hinton.....</i> | 33 |
| 2.2.7 | <i>Siembra por agotamiento.....</i> | 35 |
| 2.2.8 | <i>Descripción Macroscópica de las colonias.....</i> | 35 |
| 2.2.9 | <i>Preparación de medios de cultivo.....</i> | 36 |
| 2.2.10 | <i>Tinción Gram.....</i> | 37 |
| 2.2.11 | <i>Caracterización bacteriana de las colonias aisladas.....</i> | 38 |
| 2.2.12 | <i>Identificación de Bacilos Gram Negativos.....</i> | 39 |
| 2.2.13 | <i>Pruebas bioquímicas.....</i> | 44 |
| 2.2.14 | <i>Antibiograma.....</i> | 47 |

CAPITULO III

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 3. | RESULTADOS Y DISCUSIONES..... | 49 |
| 3.1 | Resultados de la medición de los Parámetros In Situ..... | 49 |
| 3.2 | Recuento de bacterias Aerobias Mesófilas..... | 50 |
| 3.3 | Recuento de bacterias <i>Escherichia coli</i> y Coliformes..... | 52 |
| 3.4 | Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i>..... | 55 |
| 3.5 | Recuento de Mohos y Levaduras..... | 57 |
| 3.6 | Número de clones aislados en el Parque de las Fuentes..... | 59 |
| 3.7 | Morfología macroscópica de las colonias bacterianas que fueron selecciones obtenidas del Parque de las Fuentes..... | 60 |
| 3.8 | Resultados de las pruebas bioquímicas de los clones aislados..... | 62 |
| 3.9 | Análisis de las bacterias identificadas en el parque de las Fuentes..... | 64 |
| 3.10 | Evaluación a la Resistencia de Antibióticos..... | 66 |

| | |
|---|----|
| <i>3.10.1 Análisis de Antibiograma de clones aislados e identificados</i> | 66 |
| CONCLUSIONES | 69 |
| RECOMENDACIONES | 70 |
| BIBLIOGRAFÍA | 71 |
| ANEXOS | 77 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | | |
|--------------------|---|----|
| Tabla 1-1: | Tipos de Aguas | 4 |
| Tabla 2-1: | Interpretación de los resultados de la Prueba de Oxidación y Fermentación | 18 |
| Tabla 3-1: | Interpretación de los Resultados de la Prueba de Citrato | 20 |
| Tabla 4-1: | Interpretación de los Resultados de la Prueba de Ureasa | 21 |
| Tabla 1-2: | Materiales, equipos y reactivos | 28 |
| Tabla 2-2: | Medios de Cultivo..... | 29 |
| Tabla 3-2: | Discos de sensibilidad para bacterias Gram negativa..... | 48 |
| Tabla 1-3: | Determinación de los valores de pH y temperatura..... | 49 |
| Tabla 2-3: | Recuento de Bacterias Aerobias Mesófilas | 50 |
| Tabla 3-3: | Recuento de <i>coliformes</i> | 53 |
| Tabla 4-3: | Recuento de <i>Escherichia coli</i> | 53 |
| Tabla 5-3: | Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> | 56 |
| Tabla 6-3: | Recuento de Mohos y Levaduras | 57 |
| Tabla 7-3: | Número de clones aislados en el parque de las Fuentes | 59 |
| Tabla 8-3: | Descripción macroscópica de los clones aislados | 61 |
| Tabla 9-3: | Pruebas bioquímicas de los clones aislados – Bacilos Gram Negativos..... | 63 |
| Tabla 10-3: | Análisis de las bacterias identificadas en el parque de las Fuentes | 64 |
| Tabla 11-3: | Antibiograma de los clones Bacilos Gram Negativos del parque de las Fuentes ... | 67 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1-1: Formas de nutrición de las bacterias..... | 7 |
| Figura 2-1: Siembra en Placa 3M Petrifilm..... | 11 |
| Figura 3-1: Siembra en Placa 3M Petrifilm para Aerobios | 11 |
| Figura 4-1: Siembra en Placas 3M Petrifilm para <i>S. aureus</i> | 12 |
| Figura 5-1: Siembra en Placas 3M Petrifilm para Mohos y Levaduras | 12 |
| Figura 6-1: Interpretación de la prueba Oxidación y Fermentación | 18 |
| Figura 7-1: Coloraciones de la prueba de glucosa y lactosa, medio Kligler | 19 |
| Figura 8-1: Coloración de la Prueba de Citrato | 20 |
| Figura 9-1: Coloración de la Prueba Ureasa..... | 21 |
| Figura 10-1: Mecanismos de resistencia bacteriana a los antibióticos | 22 |
| Figura 1-2: Técnica de Petrifilm 3M, paso 1..... | 31 |
| Figura 2-2: Técnica de Petrifilm 3M, paso 2..... | 31 |
| Figura 3-2: Técnica de Petrifilm 3M, paso 3..... | 32 |
| Figura 4-2: Técnica de Petrifilm 3M, paso 4..... | 32 |
| Figura 5-2: Técnica de Petrifilm 3M, paso 5..... | 32 |
| Figura 6-2: Técnica de Petrifilm 3M, paso 6..... | 33 |
| Figura 7-2: Técnica de Petrifilm 3M, paso 7..... | 33 |

ÍNDICE DE IMÁGENES

| | | |
|---------------------|--|----|
| Imagen 1-1: | Parque de las Fuentes | 24 |
| Imagen 2-1: | Parque de las Fuentes | 24 |
| Imagen 1-2: | Sitios de muestreo (A y B) del Parque de las Fuentes | 26 |
| Imagen 2-2: | Siembra por agotamiento | 35 |
| Imagen 3-2: | Descripción macroscópica | 36 |
| Imagen 4-2: | Prueba de Oxidasa..... | 39 |
| Imagen 5-2: | Siembra en agar EMB | 40 |
| Imagen 6-2: | Siembra en agar manitol salado | 41 |
| Imagen 7-2: | Siembra en agar MacConkey | 42 |
| Imagen 8-2: | Siembra en agar <i>Salmonella Shigella</i> | 43 |
| Imagen 9-2: | Inoculación en medio Kligler | 45 |
| Imagen 10-2: | Inoculación en medio Citrato | 46 |
| Imagen 11-2: | Inoculación en medio SIM | 47 |
| Imagen 12-2: | Antibiograma | 48 |

ÍNDICE DE GRÁFICAS

| | | |
|---------------------|---|----|
| Gráfica 1-3: | Porcentaje de Bacterias Aerobias Mesófilas | 51 |
| Gráfica 2-3: | Porcentaje de coliformes..... | 53 |
| Gráfica 3-3: | Porcentaje de <i>Escherichia coli</i> | 54 |
| Gráfica 4-3: | Porcentaje de <i>Staphylococcus aureus</i> | 56 |
| Gráfica 5-3: | Porcentaje del Recuento de Mohos y Levaduras..... | 58 |
| Gráfica 6-3: | Porcentaje del Número de clones aislados en el parque de las Fuentes..... | 59 |
| Gráfica 7-3: | Porcentaje de bacterias identificadas en el parque de las Fuentes | 65 |

ÍNDICE DE ANEXOS

| | |
|-----------------|---|
| ANEXO A: | Parque de las Fuentes..... |
| ANEXO B: | Medición de los parámetros in situ..... |
| ANEXO C: | Toma de muestras sitio A y B..... |
| ANEXO D: | Siembra por el método de Petrifilm en las muestras A y B..... |
| ANEXO E: | Placa de recuento de bacterias de <i>Staplylococcus aureus</i> de las muestras A y B |
| ANEXO F: | Placa de Recuento de Aerobios Mesófilos de las muestras Ay B..... |
| ANEXO G: | Placa de recuento de <i>E.coli/coliformess</i> de las muestras A y B..... |
| ANEXO H: | Placa de recuento de mohos y levaduras de las muestras A y B..... |
| ANEXO I: | Realización de repiques..... |
| ANEXO J: | Siembra por agotamiento..... |
| ANEXO K: | Clones Obtenidos..... |
| ANEXO L: | Tinción Gram..... |
| ANEXO M: | Pruebas bioquímicas..... |
| ANEXO N: | Prueba de la Catalasa..... |
| ANEXO O: | Pruebas de Identificación para bacilos Gram negativos..... |
| ANEXO P: | Antibiograma..... |

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue cuantificar las bacterias aerobias mesófilas, coliformes y bacterias patógenas presentes en el Parque de las Fuentes del Cantón Guano, Provincia de Chimborazo. Se inició con la medición de los parámetros *in-situ*, temperatura y pH, luego se tomaron muestras de 2 sitios de pozos artesianos. La identificación microbiana se realizó en placas 3M™ Petrifilm™ de Aerobios, *E.coli*, Coliformes, *Staphylococcus*, mohos y levaduras, una vez crecidas las colonias se describió su morfología macroscópica. El aislamiento fue realizado en Agar Mueller-Hinton, y las colonias aisladas fueron caracterizadas utilizando la tinción Gram, pruebas bioquímicas, fisiológicas, de cultivo, de identificación y pruebas antibiograma a los clones puros aislados, empleando el método de Kirby Bauer, para ello se preparó una suspensión bacteriana y se inoculó en Mueller Hinton, se colocó los discos de antibióticos, se incubó para posteriormente medir el diámetro de inhibición para compararlo con la tabla de referencia y así reportar como sensible o resistente a cada uno de los antibióticos usados. El análisis dio como resultado que los 20 clones aislados eran bacilos Gram negativo en un 100% y correspondían a las especies *Escherichia coli* (13clones), *Klebsiella pneumoniae* (5clones), *Enterobacter cloacae* (2clones). En relación al antibiograma 3 clones de *E.coli* fueron resistentes al Imipenem y Gentamicina, y 2 clones de *Enterobacter cloacae* resistentes a la Kanamicina. En conclusión se deben tomar medidas que ayuden a disminuir la contaminación de las fuentes de agua y realizar estudios microbiológicos frecuentes que garanticen su calidad sanitaria. Se recomienda al Gobierno Autónomo Descentralizado del cantón Guano socializar estos resultados y realizar análisis microbiológicos constantes para controlar los parámetros de calidad, protegiendo así la salud de los usuarios que acuden a este lugar.

Palabras claves: <BIOQUÍMICA><MICROBIOLOGÍA><ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO><FUENTES DE AGUA><POZOS ARTESIANOS><PARQUE DE LAS FUENTES ><PLACAS PETRIFILM><PRUEBAS BIOQUÍMICAS><ANTIBIOGRAMA><CALIDAD SANITARIA> GUANO (CANTON) > <CHIMBORAZO (PROVINCIA)>

SUMMARY

The objective of this research was to quantify the mesophilic aerobic bacteria, coliforms and pathogenic bacteria present in the Fuentes Park, Guano Canton, Chimborazo Province. It began with the measurement of *in-situ* parameters, temperature and pH, then samples of 2 sites of artesian wells were taken. Microbial identification was performed on 3M™ Petrifilm™ plates of: *E.coli*, Coliforms, *Staphylococcus*, molds and yeasts, once the colonies were overgrown their macroscopic morphology was described. Isolation was performed on Mueller-Hinton Agar, and isolated colonies were characterized using Gram staining, biochemical, physiological, culture, identification and antibiogram test to isolated pure clones, using the Kirby Bauer method for this purpose, a bacterial suspension was prepared and inoculated into Mueller- Hinton, the antibiotic discs were placed, incubated for later measurement of the inhibition diameter to compare it with the reference table and thus report as sensitive or resistant to each of the antibiotics used. The analysis showed that the 20 clones isolated were Gram – negative bacilli in 100% and corresponded to the species *Escherichia coli* (13clones), *Klebsiella pneumoniae* (5clones), *Enterobacter cloacae* (2clones). In relation to the antibiogram 3 clones of *E.coli* were resistant to Imipenem and Gentamicina, and 2 clones of *Enterobacter cloacae*, resistant to Kanamycin. In conclusion, measures should be taken to help reduce pollution of water sources and to conduct frequent microbiological studies to ensure its sanitary quality. It is recommended that the Decentralized Autonomous Government of Guano canton socializes these results and perform constant microbiological analyzes to control the parameters of quality, thus protecting the health of users who come to this place.

Key words: <BIOCHEMISTRY><MICROBIOLOGY><MICROBIOLOGICAL ANALYSIS><SOURCES OF WATER><ARTESIAN WELLS><THE FUENTES PARK ><PETRIFILM PLATES><BIOCHEMICAL TESTS><ANTIBIOGRAM><HEALTH QUALITY> GUANO (CANTON) > <CHIMBORAZO (PROVINCE)>

INTRODUCCIÓN

El Ecuador posee una gran cantidad de fuentes de agua gracias a su ubicación geográfica en el cinturón de fuego del Pacífico, donde acuden numerosas personas a estos lugares, razón por la cual se ha realizado varios estudios sobre las propiedades fisicoquímicas de estas fuentes de aguas, pero al momento no existen estudios que se centren en su diversidad microbiológica, tomando en cuenta que el agua es el elemento más importante para la vida y es uno de los medios más comunes para la transmisión de todo tipo de microorganismos. (CABRERA, 2015)

En la Constitución del Ecuador se reconoce el derecho de los ciudadanos al agua, derecho que debe ser garantizado mediante la adopción de medidas de preservación y uso racional de las fuentes de agua. (INAMHI, 2011)

De aquí la importancia de establecer un estudio del control de calidad de fuentes de agua de nuestro país, que es un factor importante para garantizar la salud de todos quienes utilizan estas fuentes, como medio de supervivencia, siendo necesario su análisis bajo parámetros y normas de calidad que garanticen el uso de las mismas, y no existan consecuencias en la salud humana, así como manifiesta la constitución de nuestro país que se basa en el Plan Nacional del Buen Vivir, en donde se reconoce el derecho de todas las personas de vivir en un ambiente sano y ecológicamente equilibrado. (CABRERA, 2015)

Para valorar la correlación existente entre la calidad del agua y la salud del ser humano, es importante saber que la microbiología es la ciencia que estudia los organismos que son demasiado pequeños para ser vistos a simple vista por el hombre, como los virus, bacterias, parásitos, algas, hongos, y protozoos; empleando medios de cultivo necesarios para el crecimiento y aislamiento de los mismos. (PRESCOTT, 2002)

A lo cual hemos creído la importancia de realizar el análisis microbiológico de las aguas del Parque de las Fuentes del Cantón Guano, perteneciente a la Provincia de Chimborazo, con el objetivo de determinar los microorganismos existentes en estas aguas, para prevenir consecuencias en la salud de quienes lo utilizan.

Para lo cual se debe asegurar que el agua proveniente de una fuente cumpla con la calidad microbiológica, las características físicas, la composición química, temperatura, los cuales están sujetos a factores externos que pueden generar cambios importantes en el agua.

Una vez que las muestras hayan sido transportadas al laboratorio de Análisis Bioquímicos y Bacteriológicos de la Facultad de Ciencias-ESPOCH, cada muestra será inoculada en placas 3M Petrifilm para la selección de *Escherichia coli* y coliformes, aerobios mesófilos, mohos y levaduras y *Staphylococcus aureus*, una vez crecidas las colonias se las contará y se describirá su morfología macroscópica. (MACFADDIN, 2003)

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

Para complementar este análisis microbiológico de las aguas del Parque de las Fuentes como un aporte al campo científico, se procedió a determinar la resistencia y sensibilidad a varios antibióticos, de algunas cepas bacterianas que fueron aisladas e identificadas en estas aguas, empleando el método de Kirby Bauer de difusión en disco, para garantizar un alto nivel de investigación que contribuirá al buen uso de las aguas de dichas fuentes.

Para realizar el antibiograma se preparará una suspensión bacteriana que en turbidez sea semejante al estándar McFarland de 0.5, se inoculará en agar Mueller Hinton, se colocarán los discos de antibióticos, se incubará, medirá el diámetro de inhibición para compararlo con la tabla de referencia y así reportar como sensible, moderadamente sensible, intermedio o resistente a cada uno de los clones aislados.

Los discos de antibióticos que se utilizarán para el antibiograma serán: ceftriaxona 30ug, trimetoprima-sulfametoxazol 25ug, amoxicilina + ácido clavulánico 30ug, kanamicina 30ug, ciprofloxacina 5ug, estreptomina 10ug, imipenem 10ug, ampicilina 10ug, gentamicina 10ug.

Para concluir, éste análisis microbiológico será una base para la búsqueda a futuro de nuevos e innovadores usos de los microorganismos presentes en las fuentes de agua, tanto en campos biotecnológicos para mejorar sus procesos, como en la industria de alimentos o medicamentos; igualmente estos conocimientos contribuirán a realizar mejoras y cambios en la gestión sanitaria del parque de las Fuentes.

CAPITULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Agua

1.1.1 *Definición y características*

El agua es una sustancia indispensable para la vida de los seres vivos, sobre todo para el ser humano, usada para desarrollar sus funciones vitales, higiene personal y sobre todo para preparar sus alimentos; es decir sin agua no hay vida. Es una molécula elemental constituida por tres átomos unidos por enlaces polares proporcionando puentes de hidrógeno entre moléculas vecinas, permitiendo así obtener punto de fusión y punto de ebullición elevados. (FERNÁNDEZ, 2012)

El agua ejecuta funciones vitales en el ser vivo manteniendo así la homeostasis, interviniendo en las reacciones químicas, es así que en la respiración celular se produce agua como resultado del rompimiento de moléculas de glucosa para extraer energía, al igual que en la síntesis de aminoácidos se origina agua. (TIERRA, 2015)

El agua constituye entre 70% y 90% de los organismos, en el ser humano adulto forma el 75% y alrededor del 60% en la vejez encontrándose en forma intracelular y extracelular, es el medio idóneo en el cual se producen todas las reacciones de los seres vivos actuando como disolvente o medio de dispersión. (TIERRA, 2015)

1.1.2 Tipos de agua

Pueden encontrarse varios tipos de agua, entre los principales tenemos:

Tabla 1-1: Tipos de Aguas

| TIPO DE AGUA | DESCRIPCIÓN |
|---------------------|--|
| Agua potable | Agua idónea para consumo animal y sobre todo humano |
| Agua salada | Agua con concentración de sales mayor a 10 000 mg/L |
| Agua dulce | Agua con baja concentración de sales |
| Agua blanda | Agua que presenta mínimas cantidades de sales disueltas |
| Agua dura | Agua que posee un número alto de iones positivos |
| Aguas grises | Aguas domésticas residuales, originada de baños, lavado de cocinas, fregaderos. |
| Agua bruta | Agua sin ningún tratamiento |
| Aguas residuales | Aguas derivadas del sistema de alcantarillado |
| Aguas muertas | Agua en estado de nula circulación, con déficit de oxígeno |
| Agua superficial | Agua natural de ríos, lagos, océanos, charcos, mares |
| Agua de suelo | Agua que se ubica en la parte superior del suelo |
| Agua subterránea | Agua que se encuentra en la zona saturada del suelo |
| Agua magnética | Agua ubicada en las profundidades impulsada a la superficie terrestre por el movimiento de rocas |

Fuente: (OCAÑA, 2015)

1.2 Microbiología del agua

1.2.1 Microbiología

La microbiología es la ciencia que se encarga del estudio de organismos, virus, bacterias, algas, hongos y protozoos, solo visibles a través del microscopio. (PRESCOTT, 2002)

Según (OCAÑA, 2015), la microbiología es la rama de la biología que se encarga del estudio de los organismos de tamaño microscópico, se basa en el estudio de los microorganismos capaces de producir alteraciones en el huésped afectando su salud y bienestar. (OCAÑA, 2015)

1.2.2 Microorganismos

Los microorganismos son seres pequeños, visibles únicamente con la ayuda del microscopio. Pueden ser de dos tipos: de tipo eucariota como los hongos y algas que poseen membrana y organelos, y de tipo procariota como las bacterias que presenta una sencilla estructura interna. (OCAÑA, 2015)

1.2.2.1 Microorganismos autóctonos

Estos microorganismos son propios de cada tipo de agua y dependen de sus propiedades fisicoquímicas como temperatura, pH, sales minerales y nutrientes. Esta población microbiana suele ser alta en el punto de emergencia, la mayoría de ellos suelen ser inactivos y tienen un mejor crecimiento en medios pobres en carbono, durante tiempos de incubación prolongados. (OCAÑA, 2015)

El número de bacterias esporuladas es bajo, las bacterias termófilas crecen a más de 45°C, de ellas la mayoría son mesófilas con temperaturas óptimas a 37°C. Según sus requerimientos nutricionales predominan las bacterias heterótrofas oligotróficas que necesitan carbono y nitrógeno, estas no suelen fermentar azúcares, pero son proteolíticas, amilolíticas, amonificantes y celulolíticas, tipos que se consideran beneficiosos porque intervienen en la autodepuración de las aguas. En menor número están los microorganismos autótrofos (cianobacterias, bacterias verdes y rojas). La mayoría son aerobias o anaerobias facultativas. (OCAÑA, 2015)

1.2.2.2 Microorganismos alóctonos

Estos microorganismos proceden de otros hábitats, están considerados como contaminantes y pueden proceder del suelo, heces o vegetación, estos conviven con los microorganismos autóctonos adaptándose a las condiciones adversas de este tipo de aguas. Dentro de ellos los de mayor interés sanitario son: *Coliformes*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Legionella*. La presencia de *Coliformes* de origen fecal se considera un grave riesgo sanitario, al igual que la *P. aeruginosa* ya que ambas son bacterias patógenas y pueden producir infecciones, su presencia puede indicar una escasa protección del manantial. (OCAÑA, 2015)

Además de ello es común encontrar, pero en poca proporción algas y hongos, principalmente de los géneros *Penicillium*, *Aspergillus* y *Alternaria*, recalcando que estos cuando se encuentran en mínimas cantidades y no afectan a la calidad sanitaria de las aguas. (OCAÑA, 2015)

1.2.3 Morfología bacteriana

Las bacterias al ser microorganismos unicelulares se reproducen por fisión binaria, su tamaño puede variar desde un diámetro de 0,2 μm como es en el caso de los micoplasmas hasta 40 μm como la *Beggiatoa gigantea*. (APELLA Ma C, 2013)

Las bacterias pueden presentar formas esféricas como los cocos, en su forma de bastón alargado como los bacilos, las de forma de bastón curvado se conocen como espirilos y las que presentan forma de coma son los vibrios. (APELLA Ma C, 2013)

1.2.4 Crecimiento microbiano

El crecimiento microbiano se define como el incremento en los constituyentes celulares, este crecimiento causa un incremento del número de células en los microorganismos que se multiplican por procesos como la gemación y fisión binaria. (PRESCOTT, 2002)

Los microorganismos sintetizan sus principales biomoléculas y obtienen su energía, están disueltos en agua, razón por la cual el crecimiento celular depende de la disponibilidad de agua. (APELLA Ma C, 2013)

Los nutrientes a partir de los cuales son requeridos en grandes cantidades se denominan macronutrientes entre ellos tenemos C,H,O,N (los más abundantes) P, S, K, Ca, Fe y Na; y los que se requieren en cantidades traza se denominan micronutrientes entre ellos: Cr, Co, Cu, Mn, Mo, Ni, Se, W, V, Zn. (APELLA Ma C, 2013)

1.3 Nutrición Bacteriana

La nutrición bacteriana es el proceso en el cual los seres vivos toman del medio los nutrientes necesarios para su crecimiento. (PAMBABAY, 2015)

La rápida adaptación de las bacterias a los distintos medios se debe a la gran versatilidad metabólica, es decir su manera de obtener materia y energía, en función a esto las bacterias pueden ser: (PAMBABAY, 2015)

- Quimioheterótrofas.- Estas bacterias utilizan un compuesto químico tanto como fuente de carbono y energía; la mayoría de bacterias patógenas pertenecen a este grupo.
- Quimioautótrofas.- Estas bacterias utilizan el CO_2 como fuente de carbono y compuestos inorgánicos como fuentes de energía.
- Fotoautótrofas.- Estas bacterias utilizan el CO_2 como fuente de carbono y la luz como de fuente de energía.
- Fotoheterorótrofos.- Estas bacterias utilizan las biomoléculas como fuente de carbono y la luz como fuente de energía. (PAMBABAY, 2015)

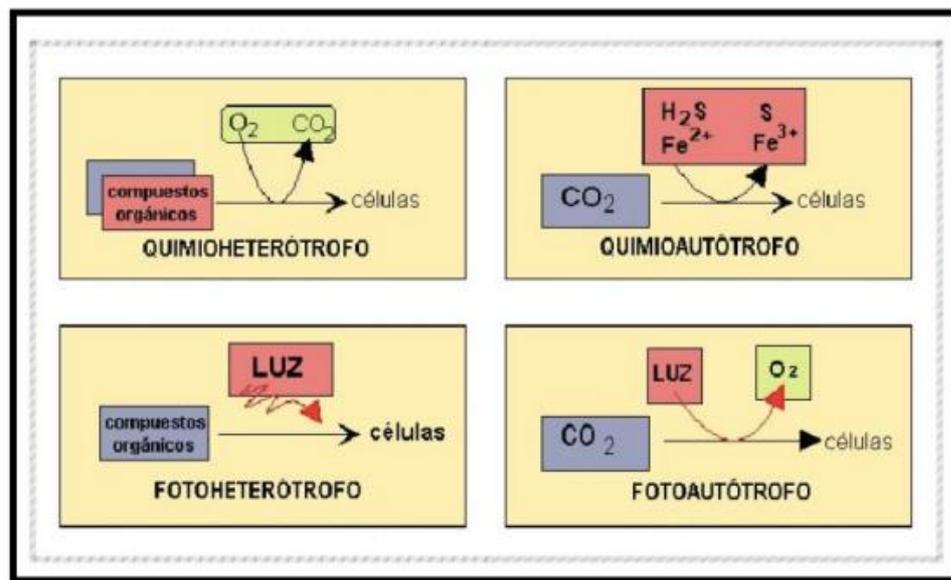


Figura 1-1: Formas de nutrición de las bacterias

Fuente: (PAMBABAY, 2015)

1.4 Medios de cultivo

Un medio de cultivo es un ambiente artificial creado por el ser humano, que provee a los microorganismos los nutrientes necesarios para su crecimiento. (APELLA Ma C, 2013)

Un medio de cultivo para ser utilizado necesita esterilización inmediata después de su preparación, para eliminar cualquier tipo de contaminación, este proceso se realiza comúnmente por calor húmedo, a menos que alguno de sus componentes sea termolábil. (APELLA Ma C, 2013)

Toda la manipulación de los medios luego de su esterilización debe ser con la mayor asepsia posible, usando material estéril, cámara de flujo laminar o cerca de la llama de un mechero. (APELLA Ma C, 2013)

1.4.1 Tipos de Medios de Cultivo

1.1.4.1 Medios de cultivo básicos

Son aquellos medios que contienen algún tipo de extracto de carne, peptona, sal y agua. Entre ellos tenemos: caldo de triptona y soya, caldo y agar nutritivo, agar cerebro corazón, dextrosa de Saborud. (BAILÓN, 2003)

1.1.4.2 Medios de cultivo enriquecidos

Son aquellos medios que han sido suplementados con líquidos corporales, vitaminas, aminoácidos, nutrientes o cualquier otro tipo de aditivos. Entre ellos: agar proteasa, agar sangre, agar chocolate, caldo de suero, agar Mueller Hinton. (BAILÓN, 2003)

1.1.4.3 Medios de cultivo selectivos

Son medios de agar básico o enriquecido que permiten el crecimiento de un determinado microorganismo impidiendo el crecimiento del resto de microorganismos, este medio es beneficioso para aislar cepas bacterianas. Entre ellos tenemos: agravado de lactosa, bilis, taurocolato. (BAILÓN, 2003)

1.1.4.4 Medios de cultivo diferenciales

Son medios a los que se les añaden ciertos reactivos que reaccionan con bacterias específicas de cierta manera visible. (BAILÓN, 2003)

1.1.4.5 *Medios de cultivo de identificación*

Medios usados para estudiar la acción de un solo tipo de bacterias frente a un sustrato determinado, se siembran con bacterias pertenecientes a un solo clon. Por ejemplo: pruebas bioquímicas. (OCAÑA, 2015)

1.1.4.6 *Medios de cultivo sólidos*

Son medios aptos para el crecimiento, aislamiento y obtención de cultivos puros de bacterias y hongos. Los medios sólidos son colocados en cajas petri de vidrio o plástico. Ejemplo: agar gelatina. (OCAÑA, 2015)

1.1.4.7 *Medios de cultivo semisólidos*

Son medios utilizados para la propagación y obtención de cultivos de bacterias anaeróbicas y para observar su metabolismo. (OCAÑA, 2015)

1.1.4.8 *Medios de cultivo líquidos*

Son medios que permiten la difusión de microorganismo, se coloca en tubos con tapa rosca o con tapones de algodón; su crecimiento es observable a través de la presencia de enturbiamiento. Ejemplo: caldo nutritivo. (OCAÑA, 2015)

1.4 Principales medios de cultivo

1.4.1 Placas 3M Petrifilm

Método microbiológico que emplea placas listas para usarse, constituye un soporte físico formado de un film superior de plástico recubierto de un adhesivo, un indicador y el gel soluble en frío y un film inferior de papel cuadriculado cubierto por un plástico, un medio de cultivo estándar y un gel soluble en frío. (PETRIFILM, 2014)

Capa petrifilm tiene una película deshidratada de medio de cultivo cubierta de nutrientes, un agente gelificante soluble en agua e indicadores, los cuales son indispensables para el

crecimiento microbiano, en estos se coloca 1mL de muestra la cual rehidrata al medio, luego de la incubación se puede hacer el recuento de microorganismos. (PETRIFILM, 2014)

Existen placas 3M Petrifilm específicas para una diversidad de microorganismos como son: recuento de aerobios totales, recuento de *E.coli*/Coliformes totales, placa de recuento Staph Express y recuento de mohos y levaduras. (MACAS, 2015)

Un análisis microbiológico en placas 3 M Petrifilm sigue los siguientes pasos:

- Siembra: levanta la película y se añade la muestra
- Incubación
- Contaje e interpretación: se puede leer fácilmente en pocos minutos (OCAÑA, 2015)

Este método proporciona mayor confianza en los resultados, porque es un método usado a nivel mundial y es aprobado por múltiples organismos como: Association of Official Analytical Chemists, Asociación Francesa de Normalización, U.S. Grade a Pasteurized Milk Ordinance, Canada- Health Protection Branch HPB (Compendium Of Analytical Methods) y Australia, New South Wales Dairy Test Manual. (MACAS, 2015)

Fundamento

Placas Petrifilm E. coli/ coliformes: esta prueba abarca dos ensayos en uno, incluye nutrientes de Bilis y Rojo Violeta, el cual es un agente gelificante soluble en agua fría, un indicador de la actividad de glucoronidasa, y un indicador que facilita el conteo de colonias. La mayoría de las *E.coli* producen β - glucoronidasa que origina un precipitado azul, el film superior atrapa el gas producido por los coliformes. (PETRIFILM, 2014)

Aproximadamente el 95% de *E. coli* producen gas, indicado por las colonias de color rojo a azules o asociadas con el gas atrapado sobre la placa. (PETRIFILM, 2014)

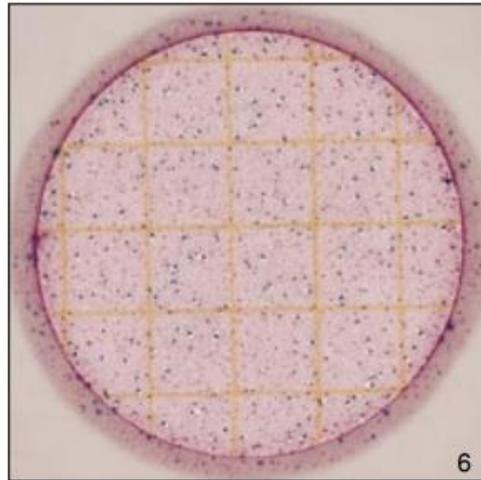


Figura 2-1: Siembra en Placa 3M Petrifilm

Fuente: (PETRIFILM, 2014)

Placas Petrifilm Recuento de Aerobios: es un medio de cultivo que contiene nutrientes del agar Standards Methods, un agente gelificante soluble en agua fría, y un tinte indicador de color rojo que facilita el recuento de las colonias formadas. (PETRIFILM, 2014)

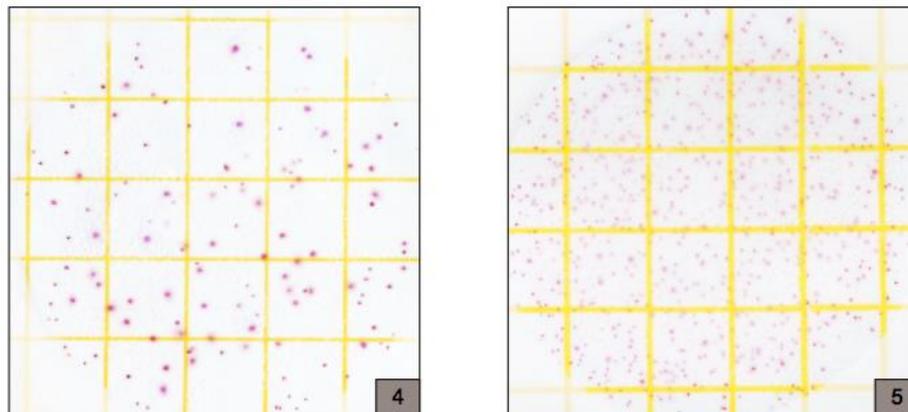


Figura 3-1: Siembra en Placa 3M Petrifilm para Aerobios

Fuente: (PETRIFILM, 2014)

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

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

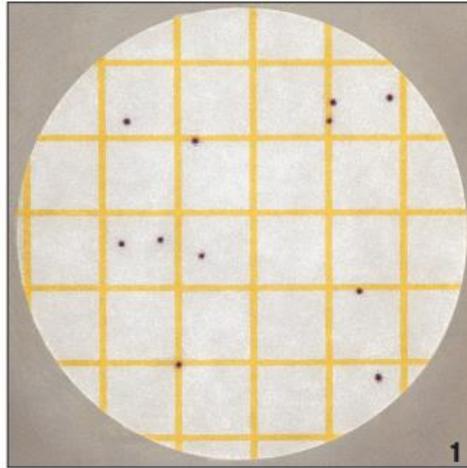


Figura 4-1: Siembra en Placas 3M Petrifilm para *S. aureus*

Fuente: (PETRIFILM, 2014)

Placas Petrifilm Mohos y Levaduras: este medio presenta nutrientes de Sabhi, dos antibióticos (clorotetraciclina y cloranfenicol), indicador de fosfatos (BCIP) un agente gelificante soluble en agua fría y un tinte indicador que permite y ayuda el recuento. Las levaduras aparecen con una coloración normalmente como colonias pequeñas verdeazuladas con bordes definidos y generalmente sin un punto negro en su centro. Los mohos suelen se pueden observar como colonias grandes de color variable, con bordes difusos y foco central. (PETRIFILM, 2014)

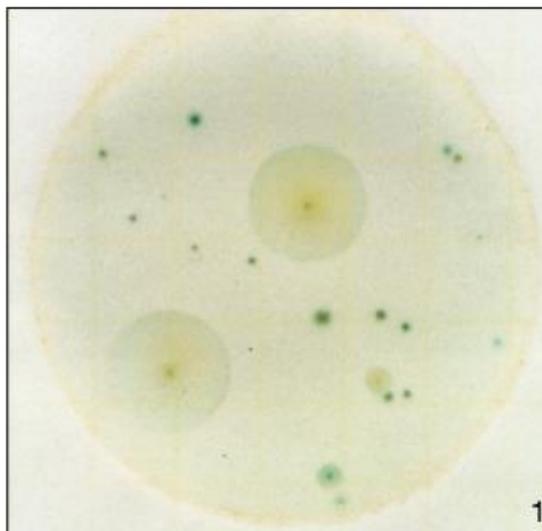


Figura 5-1: Siembra en Placas 3M Petrifilm para Mohos y Levaduras

Fuente: (PETRIFILM, 2014)

1.4.2 AGAR EMB (agar con eosina y azul de metileno)

Método usado como medio de diferenciación, para cultivar flora Gram negativa; contiene lactosa que permite diferenciar a los microorganismos fermentadores de azúcar, eosina, azul de metileno inhibiendo la mayor parte de bacterias Gram positivas. Su composición en g/L de agua destilada es: 10g de peptona, 10g de lactosa, 2g de fosfato dipotásico, 0,4g de eosina, 0,2065g de azul de metileno, 15g de agar y un pH de 6,8. (OCAÑA, 2015)

1.4.3 Agar Mueller Hinton

Usado como medio de elección para antibiogramas, permitiendo el crecimiento de todo tipo de células bacterianas; este medio es enriquecido, su composición en g/L de agua destilada es: 300g de infusión de carne, 17,5 de hidrolizado de caseína, 1,5g de almidón, 17 g de agar y un pH de 7,4. (OCAÑA, 2015)

1.4.4 Agar MacConkey

Utilizado para el aislamiento de bacterias Gram negativas, aerobios, y anaerobios facultativos, es considerado como un medio diferencial, contiene una mezcla de sales biliares y cristal violeta que inhibe el crecimiento de bacterias Gram positivas. (MACAS, 2015)

1.4.5 Agar Manitol Salado

Empleado para el aislamiento y diferenciación de estafilococos; este medio es considerado como un medio selectivo y diferencial. (MACAS, 2015)

1.4.6 Agar de Citrato de Simmons

Medio que permite diferenciar enterobacterias, se utiliza para definir si el microorganismo evaluado tiene la capacidad de utilizar solo el citrato como fuente de carbono. (MACAS, 2015)

1.4.7 Agar Salmonella Shigella

Este agar es un medio diferencial, altamente selectivo usado en el aislamiento de Salmonella y Shigella. El verde brillante, sales biliares y altas concentraciones de tiosulfato y citrato inhiben bacilos Gram negativos y cocos Gram positivos. (NUÑEZ, 2015)

Las colonias lactosa positiva aparecen de color rosas o rojas. Las colonias lactosa negativa son incoloras. Existen bacterias que producen sulfhídrico por reducción del tiosulfato, en presencia de iones hierro, observando colonias con centro negro. (NUÑEZ, 2015)

1.4.8 Agar Hugh Leifson

Es un medio de cultivo, que al ser suplementado con hidratos de carbono se utiliza para determinar el metabolismo oxidativo-fermentativo de bacterias Gram negativas. Además puede diferenciar movilidad y producción de gas. (MACFADDIN, 2003)

1.4.9 Agar Kligler

Es un medio diferencial del genero *Enterobacteriaceae*, este medio es colocado en tubos, determina la capacidad de un microorganismo para producir fermentación de hidratos de carbono (1% de lactosa y 0.1% de glucosa) en un medio basal, con o sin producción de gas y la producción de ácido sulfhídrico (H₂S). (NUÑEZ, 2015)

1.4.10 Agar SIM

Es un medio semisólido utilizado para la identificación y diferenciación de microorganismos del género de *Enterobacteriaceae* basándose en su movilidad, indol, y producción de sulfuro de hidrógeno. (NUÑEZ, 2015)

La prueba de indol determina la capacidad de un microorganismo para separar indol a partir del triptófano. La movilidad se demuestra por el enturbiamiento del medio o por el crecimiento que difunde más allá de la línea de inoculación. Y la formación de sulfuro se evidencia por la formación de un precipitado negro. (NUÑEZ, 2015)

1.4.11 Agar Urea

Es un medio utilizado para la determinación de bacilos entéricos, basándose en la actividad ureásica. Las bacterias que poseen la enzima ureasa que descomponen compuestos orgánicos, usaran el nitrógeno que proviene de la urea, para hidrolizar y liberar amoniaco y dióxido de carbono. Estos productos metabolizan y alcalinizan el medio haciendo un viraje de amarillo al rojo. (MACFADDIN, 2003)

1.4.12 Agar Citrato Simons

Medio utilizado en la determinación de un microorganismo para usar el citrato como única fuente de carbono y energía, el metabolismo y crecimiento, mediante la alcalinidad. (NUÑEZ, 2015)

1.5 Identificación de microorganismos

Para poder identificar a los microorganismos se necesita realizar un sin número de métodos y técnicas, que facilitaran el aislamiento de un cultivo puro, para poder identificarlo mediante pruebas microbiológicas, las que nos permitirán determinar la familia, género y especie del microorganismo. (MACAS, 2015)

1.5.1 Inoculación y aislamiento de bacterias

El inóculo es el material que se inócula, es una suspensión de microorganismos que se transfieren a un ser vivo o a un medio de cultivo a través de la inoculación. El aislamiento de bacterias se desarrolla inoculando un medio de cultivo utilizando el método de “siembra por estría cruzada en placa”, en el cual las células microbianas resultan separadas en el transcurso de 18 -24 horas, desarrollándose masas visibles a lo que se denomina: colonias. (MACAS, 2015)

La siembra por estría en placa permite aislar bacterias que dan paso a colonias separadas y que transfiriéndolas a un nuevo medio de cultivo, permite el desarrollo de cultivos bacterianos puros. (MACAS, 2015)

1.5.2 Repiques

El objetivo de los repiques es conservar las bacterias frescas previo para desarrollar los análisis microbiológicos, ayudando en el proceso de purificación de las cepas bacterianas. Para proceder a los repiques se toma una pequeña porción de la colonia con la punta del asa estéril y se inócula en un nuevo medio de cultivo. (MACAS, 2015)

1.5.3 Cultivo puro de bacterias

Se considera un cultivo puro aquel que contiene un solo tipo de microorganismos, existe gran variedad de técnicas de aislamiento la mayor parte son usadas en medios de cultivos sólidos, sobre los que se desarrollan colonias macroscópicas. (GAMAZO, 2005)

1.5.4 Preparación y tinción de las muestras

Para que los microorganismos sean visibles claramente en el microscopio es necesario fijar y teñir las placas, con el fin de mejorar la resolución e identificar las características morfológicas propias de cada uno de los microorganismos. (GAMAZO, 2005)

1.5.4.1 Tinción Gram

Es una prueba rápida utilizada para clasificar las bacterias de acuerdo a la estructura de la pared bacteriana, para la identificación de ellas se debe tomar en cuenta su color: luego de haber sido teñidas usando los reactivos: cristal violeta (1min), lugol (1min), decolorante (30seg) y safranina (1min). (MACAS, 2015)

Las Gram positivas son de color rojo, presentan una gruesa capa de peptidoglicano con numerosos enlaces cruzados de ácido teicoico, que le permite ser más resistente a la decoloración con alcohol; y las Gram negativas presentan color violeta, su pared bacteriana tiene una capa muy fina de peptidoglicano por lo que se decolora con mayor facilidad con el alcohol. (MACAS, 2015)

1.6 Pruebas Bioquímicas

1.6.1 Pruebas bioquímicas de lectura rápida

1.6.1.1 Prueba de Catalasa

La finalidad de esta prueba es determinar la presencia de la enzima catalasa en las bacterias, la que hace posible que el peróxido de hidrógeno se descomponga en oxígeno y agua. El peróxido de hidrógeno (H_2O_2), se forma como producto final oxidativo de la descomposición de los azúcares produciendo la muerte de la célula por ser muy tóxico. (MACFADDIN, 2000)

Según (PAMBABAY, 2015), es una enzima que forma parte de casi todas las bacterias que tienen citocromos (proteínas que interviene en el transporte de energía). Esta enzima al entrar en contacto con el peróxido de hidrogeno lo hidroliza en agua y oxígeno, este último es rápidamente observable pues se presenta en forma de burbujas (PAMBABAY, 2015)

1.6.1.2 Prueba de la Oxidasa

Esta prueba permite conocer si la bacteria posee enzimas oxidasas, la reacción se debe a que el sistema citocromooxidasa activa la oxidación del citocromo que es reducido en presencia de oxígeno molecular a agua o peróxido de hidrógeno dependiendo de la especie de la bacteria, el oxígeno es el aceptor final de electrones en el sistema de transferencia de electrones. (OCAÑA, 2015)

1.6.2 Pruebas bioquímicas de lectura lenta

1.6.2.1 Oxido fermentación

Prueba que identifica si los microorganismos utilizan los hidratos de carbono por vía oxidativa (proceso aeróbico, presencia de oxígeno) o por vía fermentativa (proceso anaeróbico, ausencia de oxígeno). (FERNANDEZ, 2010)

Fundamento

Identifica si las bacterias metabolizan un hidrato de carbono por oxidación o fermentación. La diferencia entre estos metabolismos es la disponibilidad de oxígeno que se les proporciona a las bacterias en este medio; la fermentación es el proceso metabólico que libera energía a partir de un azúcar todo esto bajo condiciones anaeróbicas.(PAMBABAY, 2015)

La ejecución de esta prueba requiere de dos tubos, el uno que crece expuesto al aire mientras que el otro es sellado con parafina para crear el ambiente anaerobio; las bacterias aerobias estrictas son oxidativas y las aerobias tolerante con las anaerobias estrictas son fermentativas (PAMBABAY, 2015)

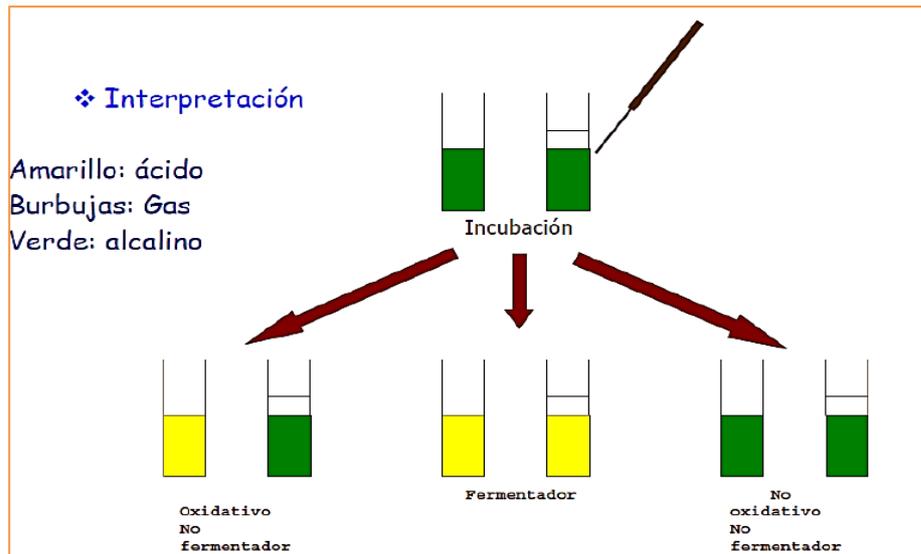


Figura 6-1: Interpretación de la prueba Oxidación y Fermentación

Fuente: (PAMBABAY, 2015)

Tabla 2-1: Interpretación de los resultados de la Prueba de Oxidación y Fermentación

| Color tubo sin parafina | Color tubo con parafina | Resultado |
|-------------------------|-------------------------|--|
| Amarillo | Verde | Oxidación (O+) no Fermentación (F-) |
| Amarillo | Amarillo | Fermentación (F+) |
| Verde | Verde | Oxidación (O+) Fermentación (F-) |

Fuente: (PAMBABAY, 2015)

1.6.2.2 Prueba de glucosa y lactosa. Medio Kligler

Fundamento

La peptona y tripteína son las sustancias que proporcionan los nutrientes necesarios para el crecimiento del microorganismo, el cloruro de sodio mantiene el equilibrio osmótico, el agar es el agente solidificante, el rojo de fenol es el indicador de pH, estos son los componentes comunes de la mayoría de medios, sin embargo existen otras sustancias que cumplen funciones para diferenciar las distintas reacciones. (PAMBABAY, 2015)

Esta prueba determina si la bacteria es fermentadora de lactosa y/o glucosa, si el microorganismo fermenta uno de estos carbohidratos, se producen ácidos, los mismos que son

revelados por el rojo de fenol provocando el cambio de color del medio. Para que se dé el precipitado negro del sulfuro de hierro, el tiosulfato de sodio se reduce a sulfuro de hierro, el mismo que reacciona con la sal de hierro. (PAMBABAY, 2015)

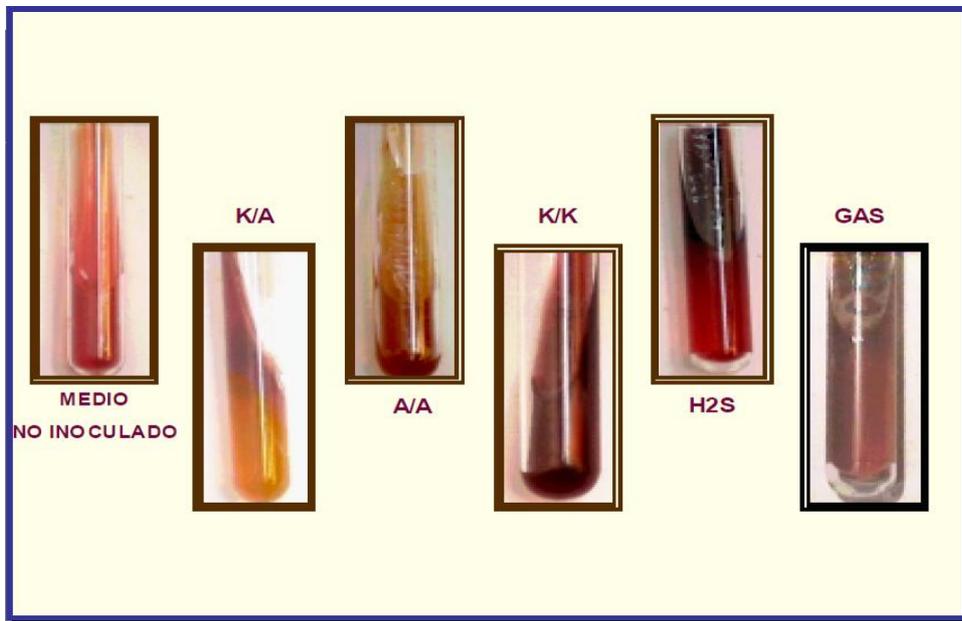


Figura 7-1: Coloraciones de la prueba de glucosa y lactosa, medio Kliger

Fuente: (BAILÓN, et al., 2003)

K / A (Fermentación de glucosa solamente)

A / A (Fermentación de glucosa y lactosa)

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

1.6.2.3 Prueba de Citrato. Medio Citrato de Simmons

Esta prueba determina si las bacterias usan el citrato como única fuente de carbono y el fosfato de amonio como fuente de nitrógeno. (MACFADDIN, 2003).



Figura 8-1: Coloración de la Prueba de Citrato

Fuente: (BAILÓN, et al., 2003)

Interpretación

Tabla 3-1: Interpretación de los Resultados de la Prueba de Citrato

| Color | Resultado |
|-------|-----------|
| Verde | - |
| Azul | + |

Fuente: (BAILÓN, et al., 2003)

1.6.2.4 Prueba de Sulfuro Indol y Movilidad. Medio SIM

Ácido sulfhídrico.- Algunas bacterias con ayuda de la enzima cisteinasa liberan azufre de los diferentes aminoácidos (aa), como resultado de la proteólisis de las proteínas. Para que se de esta reacción las bacterias reaccionan con el tiosulfato de sodio produciendo ácido sulfhídrico SH₂ el mismo que reacciona con el citrato férrico de amonio lo que produce un precipitado insoluble de color negro. (PAMBABAY, 2015)

Indol.- El indol es la sustancia que se libera de la degradación del aminoácido triptófano, esta reacción es catalizada por la enzima triptofanasa. La prueba del indol determina si la bacteria tiene la enzima que degrada el triptófano; y se basa en la formación de un complejo rojo, este complejo se forma cuando el indol reacciona con el grupo aldehído del compuesto p-dimetilaminobenzaldehído o reactivo de Kovacs. (PAMBABAY, 2015)

Movilidad.- En este medio se puede observar la movilidad de las bacterias como una nube que se forma fuera del lugar del inoculo, esto indica que la bacteria tiene flagelos que son los responsables de brindar movilidad a los microorganismos; estos flagelos pueden ser muchos o pocos según sea la especie bacteriana. (PAMBABAY, 2015)

1.6.2.5 Prueba de la Ureasa. Medio Urea

Establece la capacidad de una bacteria para utilizar el nitrógeno proveniente de la urea, la reacción se da con intervención de la enzima ureasa, la cual hidroliza la urea en amoníaco y dióxido de carbono. Con estos productos el medio de cultivo se alcaliniza haciendo que el indicador de pH vire de color el medio, de amarillo a rosa. (PAMBABAY, 2015)



Figura 9-1: Coloración de la Prueba Ureasa

Fuente: (BAILÓN, et al., 2003)

Interpretación

Tabla 4-1: Interpretación de los Resultados de la Prueba de Ureasa

| Color | Resultado |
|----------|-----------|
| Rosado | + |
| Amarillo | - |

Fuente: (PAMBABAY, 2015)

1.7 Resistencia Bacteriana a los Antibióticos

1.7.1 Antibióticos

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

1.7.2 Mecanismo de resistencia

La flora microbiana natural del suelo, agua, etc. desarrolla mecanismos para defenderse de la actividad de los antibióticos, es decir que estos son mecanismos naturales de resistencia, anteriores al uso en el ámbito clínico de los antibióticos. (KONEMAN, 2006)

1.7.3 Resistencia antimicrobiana

Es la capacidad que posee un microorganismo para resistir los efectos de un antibiótico, su aparición en una bacteria afecta el costo de la atención sanitaria, pérdida de la eficacia de ciertos medicamentos, incremento del sufrimiento humano y a menudo lleva a la muerte de las personas. (MADIGAN, 2015)

| MECANISMO | GRUPO DE ANTIBIÓTICOS | EJEMPLOS |
|---|--|---|
| Inactivación enzimática | β-lactámicos | β-lactamasas: penicilinasas; cefalosporinasas; carbapenemasas |
| | Aminoglucósidos | Enzimas modificadoras de los aminoglucósidos de las bacterias gramnegativas y grampositivas |
| Alteración de los receptores | β-lactámicos | Proteínas de unión a penicilina alteradas de las bacterias gramnegativas y grampositivas |
| | Alteraciones ribosómicas | Tetraciclina; eritromicina; aminoglucósidos |
| Alteración del transporte de antibióticos | Alteraciones de la DNA girasa | Quinolonas |
| | Enzimas bacterianas alteradas | Sulfametoxazol; trimetoprim |
| | Alteraciones en las proteínas de la membrana externa (porinas) | Bacterias gramnegativas; ingreso reducido |
| | Reducción de la fuerza impulsora proteica | Aminoglucósidos y bacterias gramnegativas; ingreso reducido |
| | Transporte activo desde las células bacterianas | Tetraciclina; eritromicina; salida activa |

Figura 10-1: Mecanismos de resistencia bacteriana a los antibióticos

Fuente: (KONEMAN, 2006)

Los microorganismos pueden presentar una resistencia al antibiótico y puede deberse a:

- Carencia por parte del organismo, de la estructura que inhibe el antibiótico; ejemplo, los micoplasmas, carecen de pared celular típica, como resultado de ello son resistentes a las penicilinas. (MADIGAN, 2015)
- Impermeabilidad del antibiótico al organismo; ejemplo, en su gran mayoría las bacterias Gram (-) son impermeables a la penicilina G. (MADIGAN, 2015)
- Inactivación del antibiótico por parte del organismo; ejemplo, diversos *estafilococos* pueden producir β -lactamasas, enzimas que rompen el anillo β -lactámico de la mayoría de penicilinas. (MADIGAN, 2015)
- Modificación de la diana del antibiótico por parte del organismo, esto se produce por un cambio genético; por ejemplo, diversos patógenos desarrollan resistencia a sulfonamidas (inhiben la producción de ácido fólico en bacterias) a través de la modificación genética de su metabolismo consiguiendo incorporar el ácido fólico ya sintetizado del medio. (MADIGAN, 2015)

1.8 Parque de las Fuentes



Imagen 1-1: Parque de las Fuentes

Elaborado por: Adriana Almendariz, 2017



Imagen 2-1: Parque de las Fuentes

Elaborado por: Adriana Almendariz, 2017

El Parque de las Fuentes se encuentra ubicado en la Cabecera Cantonal de Guano, Barrio la Matriz a dos cuadras del Parque Central, perteneciente a la provincia de Chimborazo. Estas vertientes son fuente de agua natural que brota de la tierra y que es usada por muchas personas del cantón para aseo personal, lavado de ropa, y para el consumo humano.

Esta investigación tiene como objetivo realizar el análisis microbiológico de dichas aguas, para poder conocer que microorganismos existen allí y ver cómo afecta la salud de la población.

CAPÍTULO II

2. METODOLOGÍA

2.1 Parte Experimental

Este capítulo contiene toda la información de la parte experimental del trabajo de investigación realizado en el “Parque de las Fuentes” que se encuentra localizado en la cabecera cantonal de Guano, perteneciente a la provincia de Chimborazo, el que tiene por objetivo analizar los microorganismos patógenos presentes en dichas aguas.

2.2 Lugar de Muestreo

Se realizó el respectivo muestreo en el Parque de las Fuentes, en donde se tomaron las muestras de dos pozos artesianos del sitio A y sitio B específicos como se muestra en la imagen 1-2, se tomó un volumen entre 75 y 100mL. El muestreo se realizó en dos días diferentes.

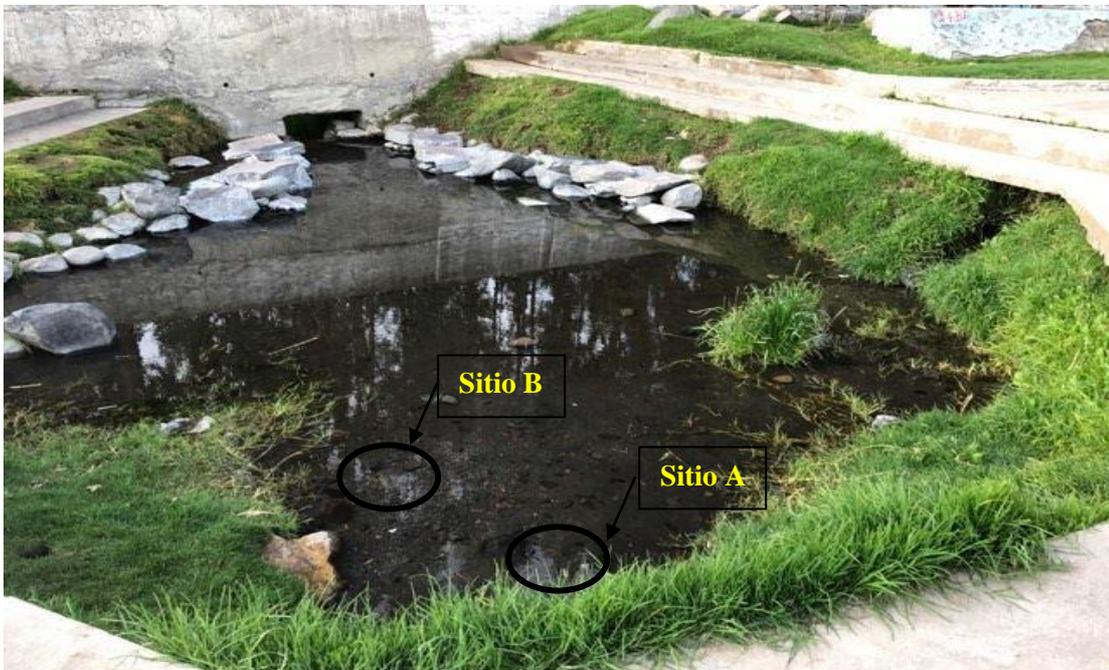


Imagen 1-2: Sitios de muestreo (A y B) del Parque de las Fuentes

Fuente: (Almendariz, 2017)

2.3 Factores de Estudio

Población: Fuentes de agua

Muestra: Fuentes de agua del Parque de las Fuentes del Cantón Guano, perteneciente a la provincia de Chimborazo.

2.4 Localización del lugar de trabajo

La investigación fue realizada en los laboratorios de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia.

LUGAR: Laboratorio clínico de la Facultad de Ciencias.

PROVINCIA: Chimborazo

CANTÓN: Riobamba

2.5 Materiales

Tabla 1-2: Materiales, equipos y reactivos

| MATERIALES | EQUIPOS | REACTIVOS |
|---------------------------|-------------------------|--------------------|
| Cooler | Reverbero | Agua destilada |
| Frascos estériles | Cámara de flujo laminar | Reactivo de Erlich |
| Cinta masking | Estufa bacteriológica | Agua oxigenada |
| Cinta parafilm | Autoclave | Suero fisiológico |
| Mascarilla | Microscopio | Cristal violeta |
| Guantes | Refrigeradora | Lugol |
| Mandil | Balanza analítica | Alcohol-cetona |
| Asa de vidrio | Esterilizador | Safranina |
| Asa de platino | | |
| Pipeta automática | | |
| Puntas azules | | |
| Puntas amarillas | | |
| Mechero de alcohol | | |
| Cajas Petri | | |
| Probeta de 250mL | | |
| Erlenmeyer de 500mL | | |
| Placas portaobjetos | | |
| Aceite de inmersión | | |
| Marcador permanente | | |
| Palillos | | |
| Hisopos | | |
| Tubos de tapa roja | | |
| Gradilla | | |
| Corchos | | |
| Tiras indicadoras de pH | | |
| Termómetro | | |
| Algodón | | |
| Papel aluminio | | |
| Vaselina sin aroma | | |
| Pipetas graduadas de 10mL | | |
| Piceta | | |

| | | |
|------------------------|--|--|
| Espátula | | |
| Tiras de oxidasa | | |
| Alcohol | | |
| Tijera | | |
| Papel bond a 4 | | |
| Discos de sensibilidad | | |
| Gasa | | |
| Algodón | | |

Fuente: (Almendariz, 2017)

Tabla 2-2: Medios de Cultivo

| MEDIOS DE CULTIVO |
|---|
| Placas 3M Petrifilm TM aeróbios |
| Placas 3M Petrifilm TM E.coli – coliformes |
| Placas 3M Petrifilm TM Mohos y levaduras |
| Placas 3M Petrifilm TM Staphexpress |
| Agar Hugh-Leifson |
| Agar Almidón |
| Agar Gelatina |
| Agar Eosina Azul de Metileno |
| Agar MacConkey |
| Agar Manitol Salado |
| Agar Kligler |
| Agar Salmonella – Shigella |
| Medio SIM |
| Agar Urea |

Fuente: (Almendariz, 2017)

2.2 Métodos

2.2.1 Muestreo

La muestra fue tomada de dos pozos artesianos del parque de las Fuentes del Cantón Guano, perteneciente a la provincia de Chimborazo, ambos pozos se encuentran dentro de la vertiente. Los muestreos fueron realizados en dos tomas, con una diferencia de 2 días, siendo el primer

muestreo el 20 de Enero con una temperatura ambiente de 8°C y el segundo muestreo el 22 de Enero con una temperatura ambiente de 8°C.

2.2.2 Toma de la muestra

Para la toma de muestra se usaron frascos estériles de plástico, se procedió a llenar las 3/4 partes del recipiente esto para tener una fácil homogenización. Para realizar la toma de la muestra del agua se colocó el frasco en contra corriente, y se realizaron tres lavados con la misma agua antes de tomar la muestra final, luego se procedió a tapar el recipiente y se realizó su respectiva codificación.

2.2.3 Análisis Físico – Químico

Esta prueba fue realizada *in situ*, usando un termómetro de mercurio y tiras indicadoras de pH, se procedió a medir la temperatura del ambiente, temperatura del agua de la fuente y pH del cada uno de los sitios muestreados.

2.2.4 Conservación y transporte de las muestras

Las muestras de agua fueron transportadas en un cooler, al Laboratorio de Análisis Clínicos de la Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia de la ESPOCH donde se realizó su respectivo análisis microbiológico.

2.2.5 Análisis Microbiológico

Una vez que la muestra fue trasladada al laboratorio, se procedió a realizar el análisis tomando las debidas precauciones y manteniendo una asepsia extrema, todo esto se desarrolló en la cámara de flujo laminar que tuvo una previa desinfección ubicando por 30 minutos la luz UV; esto se realizó para evitar posibles contaminaciones.

2.2.5.1 Siembra de microorganismos en placas Petrifilm 3M

La siembra de la muestra de agua, se realizó dentro de la cámara de flujo laminar, se realizó en una superficie plana usando las placas 3M Petrifilm TM dependiendo de cada tipo de microorganismo como:

- Aerobios mesófilos
- *E.coli/coliformes*
- *Staphylococcus aureus*
- Mohos y levaduras
-

Cada una de las placas tuvo una previa codificación para en lo posterior no tener inconvenientes.

2.2.5.2 Técnica de siembra en placas Petrifilm TM según 3M™

1. Se colocó la placa Petrifilm en una superficie plana. Levantamos el film superior. (PETRIFILM, 2014)

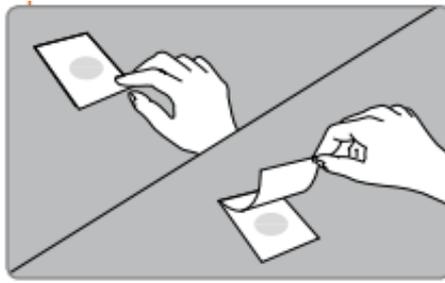


Figura 1-2: Técnica de Petrifilm 3M, paso 1

Fuente: (PETRIFILM, 2014)

2. Se pipeteo 1 ml de muestra al centro aproximadamente del film inferior. Se mantuvo la pipeta en posición vertical. No se tocó el film inferior mientras se pipeteo. (PETRIFILM, 2014)

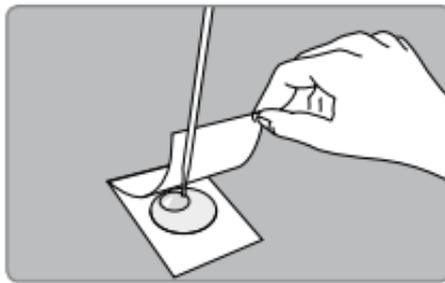


Figura 2-2: Técnica de Petrifilm 3M, paso 2

Fuente: (PETRIFILM, 2014)

3. Se soltó el film superior y se lo dejó caer. (PETRIFILM, 2014)

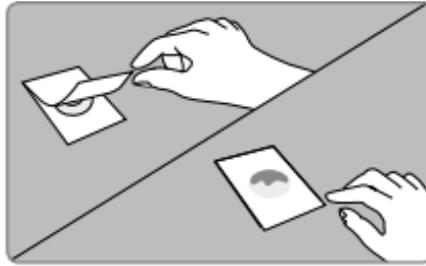


Figura 3-2: Técnica de Petrifilm 3M, paso 3

Fuente: (PETRIFILM, 2014)

4. Colocamos el aplicador en el film superior bien centrado sobre el inóculo. Usamos el aplicador con la cara rebajada hacia abajo. (PETRIFILM, 2014)

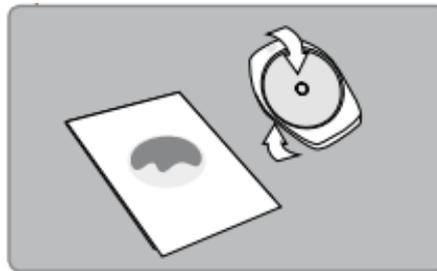


Figura 4-2: Técnica de Petrifilm 3M, paso 4

Fuente: (PETRIFILM, 2014)

5. Aplicamos presión de manera suave sobre el aplicador para distribuir el inóculo por toda la zona circular. (PETRIFILM, 2014)

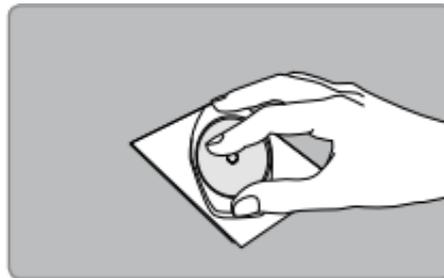


Figura 5-2: Técnica de Petrifilm 3M, paso 5

Fuente: (PETRIFILM, 2014)

6. Levantamos el aplicador. Esperamos 1 minuto para que se solidifique el gel. (PETRIFILM, 2014)

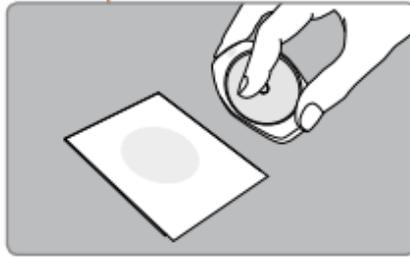


Figura 6-2: Técnica de Petrifilm 3M, paso 6

Fuente: (PETRIFILM, 2014)

7. Incubamos las placas Petrifilm de acuerdo a la temperatura especificada en cada tipo de placa colocamos cara arriba y apiladas en grupos de no más de 20 placas. Incubamos a 30 +/-1°C durante 72 +/-2.(PETRIFILM, 2014)

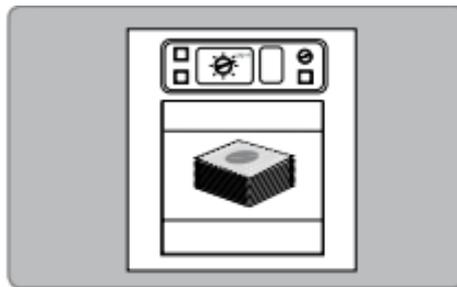


Figura 7-2: Técnica de Petrifilm 3M, paso 7

Fuente: (PETRIFILM, 2014)

2.2.6 Preparación y repiques en agar Mueller Hinton

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

2.2.6.1 Preparación del agar

- Colocamos los gramos calculados de agar Mueller Hinton, en cantidad de agua destilada de acuerdo a lo requerido por la técnica. (38g en 1L de agua destilada).
- Calentamos con agitación frecuente y hervimos hasta que se disuelva totalmente.
- Se procedió a autoclavar a 15 psi a 121° C por un lapso de 15 minutos.
- Enfriamos y colocamos en las cajas petri estériles, con un volúmen aproximado de 15 mL sobre una superficie horizontal.

- Dejamos solidificar el medio de cultivo
- Almacenamos las placas de cultivo en bolsas de plástico a una temperatura de 2-8 °C.)

2.2.6.2 *Repiques*

- Seleccionamos las colonias más representativas de las distintas placas petrifilm y se procedió a la realización de los repiques.

PRIMER REPIQUE:

- En el interior de la cámara de flujo laminar levantamos el film superior de la placa de petrifilm y con un palillo estéril tomamos la colonia seleccionada y repicamos en el agar Mueller Hinton, este paso se repitió con todas las colonias que fueron previamente seleccionadas.
- Incubamos a 37°C por un lapso de 24 horas.
- Transcurrido este tiempo se describió las colonias tomando en cuenta las siguientes características: color, tamaño, bordes, forma, entre otras.

SEGUNDO REPIQUE:

- Se tomaron las colonias que crecieron en el primer repique y se procedió a realizar el siguiente repique, se realizó con ayuda de un palillo estéril tocando la colonia y repicando sobre la placa de agar Mueller Hinton haciendo uso de una cuadrícula para guiarse en la siembra de las colonias.
- Incubamos a 37°C por un lapso de 24 horas.
- Transcurrido este tiempo se describió y se observó las características macroscópicas de las colonias.

TERCER Y CUARTO REPIQUE:

- Este proceso se realizó con las colonias del segundo repique siguiendo los pasos descritos anteriormente, este proceso se realiza las veces que sean necesarias con el fin de obtener clones estabilizados.

2.2.7 *Siembra por agotamiento*

La siembra por agotamiento se realizó utilizando las colonias crecidas a partir del cuarto repique realizado.

Se tomó una pequeña cantidad de colonia bacteriana y se extendió la muestra realizando líneas horizontales como se observa en la imagen 2-2, tratando de que el extendido sea lo más largo posible con el propósito de conseguir al final del estriamiento colonias aisladas.



Imagen 2-2: Siembra por agotamiento

Fuente: Adriana Almendariz, 2017

2.2.8 *Descripción Macroscópica de las colonias*

1. Una vez pasado el tiempo de incubación se observó las placas en contra luz.
2. Identificamos la forma de las colonias aisladas (circular, puntiforme, irregular, etc.), para caracterizar los clones aislados de acuerdo a las siguientes características:
 - Tamaño
 - Bordes (entero, ondulado, filamentosos)
 - Superficie (lisa, rugosa, plegada)
 - Consistencia (cremosa, membranosa).
 - Color
 - Elevación (plana, elevada, convexa)
 - Luz transmitida a través de la colonia (opaca, translúcida, transparente)
 - Luz reflejada en la superficie de la colonia (opaca, brillante)



Imagen 3-2: Descripción macroscópica

Fuente: Adriana Almendariz, 2017

2.2.9 Preparación de medios de cultivo

2.2.9.1 Agar Eosina Azul de Metileno, Manitol salado. MacConkey, Salmonella Shigella

- Se pesó en papel aluminio el agar según lo indicado en la técnica de cada uno de los medios.
- Se colocó el agar en un matraz y se disolvió en cierta cantidad de agua destilada según la cantidad de medio que se esté preparando.
- Se calentó en un reverbero el agar hasta ebullición, esto ayudó a que el medio tenga una completa dilución.
- La boca del matraz fue sellado con un corcho hecho de algodón y gasa, esto se realizó para no tener contacto con el ambiente y no pueda contaminarse.
- Luego se esterilizó el medio de cultivo en la autoclave a una temperatura de 121°C por 25 minutos.
- Una vez finalizada la esterilización se dejó enfriar el medio hasta que alcance una temperatura de 45 – 50°C aproximadamente
- En el interior de la cámara de flujo laminar se distribuyó el medio en las cajas Petri estériles.
- Finalmente se dejó reposar el medio de cultivo hasta que se solidificó totalmente.

2.2.9.2 *Agar Kligler, SIM, Urea, y Citrato de Simmons*

- Se pesó en canastillas de papel aluminio la cantidad necesaria de agar, dependiendo de la técnica de cada uno de los medios.
- Colocamos la cantidad de agar en un matraz y se disolvió en agua destilada según lo que requiera cada medio.
- Calentamos en un reverbero hasta punto de ebullición, esto ayudó a que el medio tenga una completa dilución.
- Esterilizamos el medio en autoclave a 121°C por el transcurso de 25 minutos.
- Transcurrido ese tiempo se procedió a enfriar el medio hasta alcanzar una temperatura de 45-50°C.
- Distribuimos en tubos de vidrio estériles, a razón de 4-5mL, dejamos solidificar en forma de pico de flauta, excepto el medio SIM que se colocó en posición vertical; posteriormente se taparon los tubos con corchos estériles.

2.2.9.3 *Agar Hugh– Leifson*

- Pesamos la cantidad de agar Hugh – Leifson necesario en papel aluminio.
- Colocamos el agar en un matraz y agregamos cierta cantidad de glucosa
- Se disolvió el agar en agua destilada y se calentó hasta punto de ebullición, esto para obtener una completa dilución.
- Esterilizamos el medio en la autoclave a una temperatura de 121 °C por un tiempo de 25 minutos.
- Transcurrido el tiempo se dejó enfriar el medio hasta alcanzar una temperatura de 40 - 45°C aproximadamente.
- En la cámara de flujo laminar distribuimos el medio en tubos de vidrio estériles, alrededor de 7ml en cada tubo y dejamos enfriar en una posición vertical.

2.2.10 *Tinción Gram*

La tinción Gram es un método que nos permite diferenciar bacterias Gram positivas y Gram negativas, éste método permite diferenciar la morfología de las bacterias que serán estudiadas en ésta investigación; para realizar la tinción Gram se debe seguir los siguientes pasos:

- Se procedió a codificar las placas porta objetos, en donde posteriormente se colocó una gota de suero fisiológico.

- Con la ayuda del asa previamente esterilizada, tomamos una muestra pequeña de la colonia, y se homogenizó en la solución.
- La placa porta objetos se fijó al calor.
- Se colocó cristal violeta en el extendido de la placa, por 1 minuto, transcurrido este tiempo se lavó con agua corriente teniendo cuidado que no se dañe el extendido.
- Se colocó gotas de lugol en el extendido de la placa, se esperó 1 minuto y se procedió a lavar la placa con agua corriente.
- Se colocó gotas de alcohol – cetona en el extendido de la placa porta objetos, se esperó 30 segundos y se procedió a lavar la placa con agua corriente.
- Se añadió gotas de safranina en el extendido, se esperó 1 minuto y se lavó con agua corriente.
- Reposamos las placas porta objetos a temperatura ambiente.
- Finalmente se colocó 1 gota de aceite de inmersión sobre el extendido y se procedió a observar la placa en el microscopio utilizando el lente de 100X.

2.2.11 Caracterización bacteriana de las colonias aisladas

2.2.11.1 Método de la Prueba de Catalasa

Para esta prueba con una aguja de inoculación se depositó una cantidad de colonia pura de un cultivo de 24 horas, sobre un porta objeto limpio. Se colocó una gota de agua oxigenada (H₂O₂), sobre los microorganismos colocados en el portaobjetos. (MACFADDIN, 2000)

Interpretación de los resultados:

- Positivo: si existe producción rápida de burbujas
- Negativo: si no existe producción de burbujas.

2.2.11.2 Prueba de Oxidasa

Para esta prueba se utilizó tiras de papel que contienen el reactivo para-amino-N-dimetil-anilina, que se oxida por la citocromo-oxidasa. Se humedeció la tira reactiva con agua destilada estéril, con la ayuda de un palillo estéril impregnamos en la tira reactiva una masa de bacterias. (MACFADDIN, 2000)

Interpretación de los resultados:

- Positivo: presencia de un color azul intenso en la tirilla
- Negativo: no hay cambio de color en tirilla

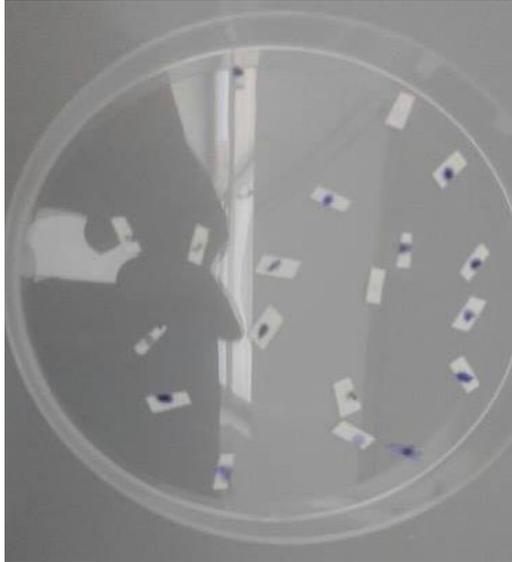


Imagen 4-2: Prueba de Oxidasa

Fuente: Adriana Almendariz, 2017

2.2.12 Identificación de Bacilos Gram Negativos

2.2.12.1 Siembra en agar Eosina Azul de Metileno

Medio de tipo de selectivo, que facilita el aislamiento de bacilos Gram negativos, es de rápido desarrollo y escasas exigencias nutricionales. Permite el desarrollo de todas las especies de la familia Enterobacteriaceae (EMB, 2010)

Procedimiento:

- Con el asa de platino previamente esterilizada, se tomó una pequeña cantidad de muestra de la colonia del agar Mueller Hinton.
- En la superficie del medio se realizó el estriado en forma de zigzag y posteriormente se procedió a incubar a 35°C en un lapso de 24 horas.

Interpretación de los resultados:

- Si las colonias tienen una coloración negro azulado o amarronado, con centro oscuro y brillo metálico el microorganismo es una *Escherichia coli*.
- Las colonias que no han cambiado de color del medio de cultivo, puede ser otro tipo de microorganismo.

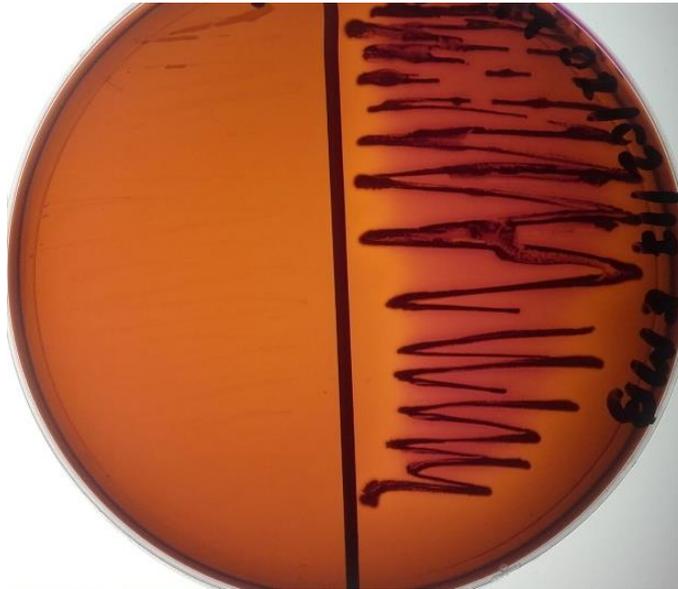


Imagen 5-2: Siembra en agar EMB

Fuente: Adriana Almendariz, 2017

2.2.12.2 Siembra en Agar Manitol Salado

Éste método permite el crecimiento de bacterias Gram positivas, inhibiendo el crecimiento de las Gram negativas.

Procedimiento:

- Con el asa de platino esterilizada, se tomó una pequeña cantidad de colonia del agar Mueller Hinton, y se inoculó en la placa que contiene agar manitol salado realizando una siembra por estriado.
- Se incubó a 35°C por el lapso de 24 horas en la estufa.

Interpretación de los Resultados:

- Cuando se presenta crecimiento de colonias amarillas que pueden presentar o no un halo, son microorganismos fermentadores de manitol.
- Presencia de colonias de color del medio que pueden presentar un halo rojizo- púrpura, son microorganismos que no fermentan manitol.



Imagen 6-2: Siembra en agar manitol salado

Fuente: Adriana Almendariz, 2017

2.2.12.3 Siembra en agar MacConkey

La siembra en agar MacConkey es utilizado para aislar bacilos Gram negativos de fácil crecimiento para aerobios y anaerobios, especialmente los de la familia *Enterobacteriaceae*.

Procedimiento:

- Con el asa de platino previamente esterilizada, se tomó una pequeña cantidad de muestra del agar Mueller Hinton.
- A continuación se procedió a realizar un estriado en la superficie del medio MacConkey.
- Se incubó a 35°C por un lapso de 24 horas.

Interpretación de los Resultados:

- Si existe la presencia de colonias rosadas-rojizas, indica la presencia de microorganismos fermentadores de lactosa.
- Si en el medio se observa colonias del color del medio y transparentes, indica que los microorganismos no son fermentadores de lactosa.



Imagen 7-2: Siembra en agar MacConkey

Fuente: Adriana Almendariz, 2017

2.2.12.4 Siembra en agar *Salmonella Shigella*

Procedimiento:

- Con la ayuda del asa previamente esterilizada, se tomó una pequeña cantidad de muestra de las colonias de agar Mueller Hinton.
- Se procedió a realizar la siembra en la superficie del medio con la técnica de estriado.
- Se incubó a 35°C por un lapso de 24 horas.

Interpretación de los Resultados:

- Cuando existe crecimiento y las colonias son de color rosadas o rojizas, indica que existen microorganismos fermentadores de lactosa.
- Cuando las colonias tienen un crecimiento de color incoloro o color del medio, indica que son microorganismos no fermentadores de lactosa.

- Cuando presentan las colonias un centro de color negro, son colonias productoras de H₂S.

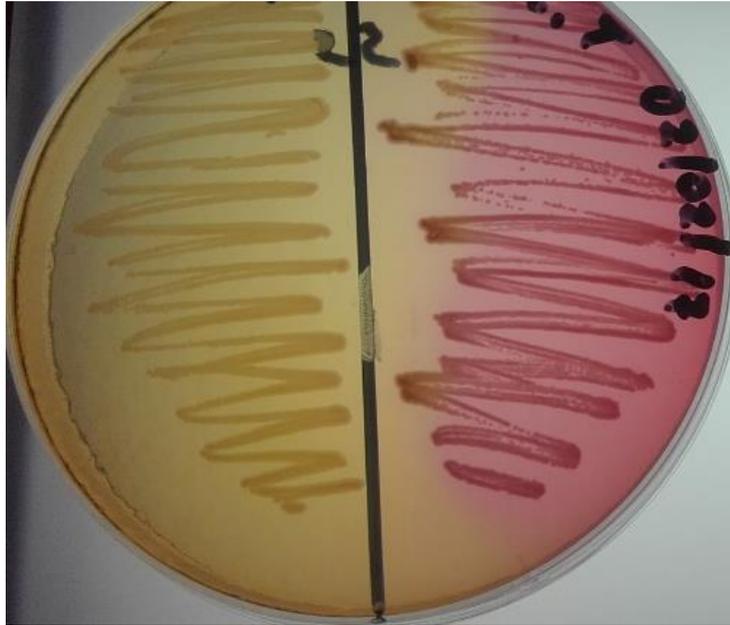


Imagen 8-2: Siembra en agar *Salmonella Shigella*

Fuente: Adriana Almendariz, 2017

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

Este medio es utilizado para conocer el metabolismo oxidativo – fermentativo de las bacterias; es utilizado como una prueba bioquímica bacteriana.

Procedimiento:

- Con la aguja de inoculación previamente esterilizada, se tomó una pequeña cantidad de muestra de una colonia y se procedió a sembrar por picadura en línea recta en los tubos que contenían este medio OF.
- Este proceso se realizó por duplicado para cada muestra, en uno de ellos se añadió 1mL de vaselina estéril, y se incubó en un ambiente de anaerobiosis; el otro tubo se quedó expuesto al aire.
- Se incubó a 35°C por 15 días, y diariamente se iban tomando las lecturas para verificar sus cambios en el transcurso de los días.

Interpretación de los Resultados:

- Cuando existe cambio en el color del medio en el tubo sin vaselina de verde a amarillo, indica que existen microorganismos oxidativos de hidratos de carbono.
- Cuando han cambiado de coloración los dos tubos de verde a amarillo, existen microorganismos fermentadores de hidratos de carbono.
- Cuando no hay cambios en los dos tubos existen microorganismos que no usan hidratos de carbono.

2.2.13 Pruebas bioquímicas

2.2.13.1 Inoculación en Medio Kligler

Este método de inoculación en medio *Kligler* permite identificar microorganismos fermentadores de glucosa y lactosa.

Procedimiento:

- Con la aguja de inoculación previamente esterilizada se tomó una pequeña cantidad de colonia y se estrió en zic-zac en el pico de flauta del medio kligler.
- Se procedió a incubar por un lapso de 24 horas a 35°C.

Interpretación de los Resultados:

- Fermenta glucosa: cuando el fondo del tubo tiene una coloración amarilla.
- Fermenta lactosa: cuando existe un cambio de color en el pico de flauta del medio.
- Si existe cambio de color en el tubo, indica que fermenta glucosa y lactosa.

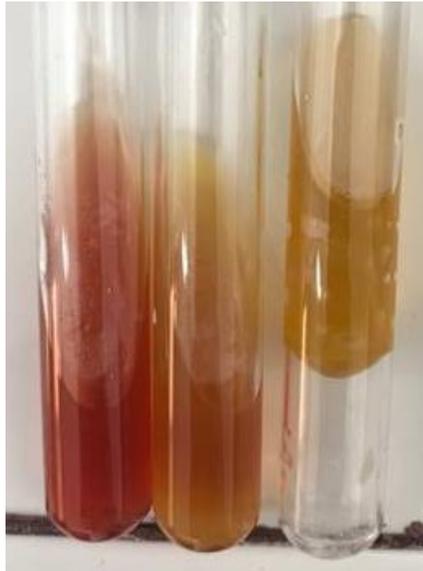


Imagen 9-2: Inoculación en medio Kligler

Fuente: Adriana Almendariz, 2017

2.2.13.2 Método de inoculación en Urea

Define la capacidad que tiene un microorganismo de hidrolizar urea en CO_2 y amoníaco por acción de la ureasa.

Procedimiento:

- Con la aguja de inoculación previamente esterilizada se tomó una pequeña cantidad de colonia y se estrió en zic-zac en el pico de flauta del medio de urea.
- Se procedió a incubar por un lapso de 24 horas a 35°C .

Interpretación de los Resultados:

Positivo: coloración del medio toma un tono rosado, sea en el pico de flauta o en todo el tubo.

Negativo: se mantiene la coloración original del medio.

2.2.13.3 Inoculación en Medio Citrato

Define la capacidad que tienen los microorganismos de usar el citrato, como fuente única de carbono, produciendo alcalinidad.

Procedimiento:

- Con la aguja de inoculación previamente esterilizada se tomó una pequeña cantidad de una colonia y se estrió en zic-zac en el pico de flauta.
- Se procedió a incubar por un lapso de 24 horas a 35°C.

Interpretación de los Resultados:

- Positiva: existen colonias en el estriado en el pico de flauta, y cuando existe cambio de color en el medio de verde a azul.
- Negativo: Mantiene el color inicial del medio.



Imagen 10-2: Inoculación en medio Citrato

Fuente: Adriana Almendariz

2.2.13.4 Método de inoculación en Medio SIM

Este método permite demostrar la producción de Indol, movilidad y de sulfuro de hidrógeno de los microorganismos.

Procedimiento:

- Con la aguja de inoculación previamente esterilizada se tomó una pequeña cantidad de colonia y se procedió a realizar una punción un poco más de la mitad del medio
- Se incubó por un lapso de 24 horas a 35°C.
- Transcurrido el tiempo de espera se añadió gotitas del Reactivo de Erlich y se agitó suavemente.

Interpretación de los Resultados:

- Si existe la formación de un anillo de color rojo en la superficie del medio indica que existe producción de Indol.
- Si no existe la formación del anillo de color rojo, en la superficie del medio, la prueba es negativa.
- Cuando se observa un crecimiento sobrepasado de la línea de siembra y el medio se vuelve turbio indica que el microorganismo presenta movilidad, caso contrario la prueba será negativa.
- Si el medio cambia a color negro existe producción de sulfuro de hidrógeno, caso contrario la prueba será negativa.

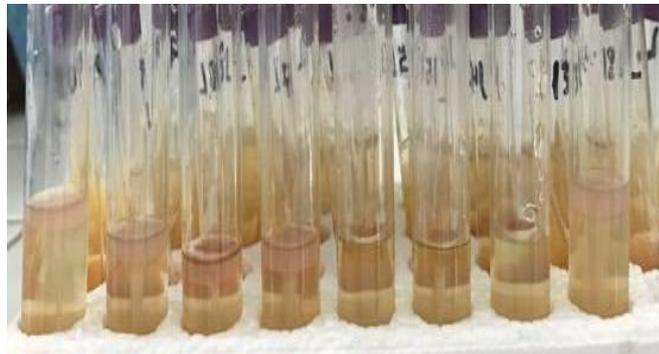


Imagen 11-2: Inoculación en medio SIM

Fuente: Adriana Almendariz, 2017

2.2.14 *Antibiograma*

Esta prueba se realizó usando la técnica Kirby Bauer, que se basa en la utilización de discos de papel filtro que contienen una cantidad específica de un antimicrobiano, estos discos fueron colocados sobre la superficie del medio de Mueller Hinton, el cual debe estar previamente inoculado con el microorganismo que va a ser evaluado. El antibiograma difunde al medio formando un gradiente de concentración que puede inhibir el crecimiento bacteriano, lo cual se determinará por la presencia de un halo de inhibición.

Los antibióticos que se utilizaron para bacterias Gram negativas fueron los siguientes:

Tabla 3-2: Discos de sensibilidad para bacterias Gram negativas

| Gram Negativos |
|-------------------------------------|
| Trimetoprima/sulfametoxazol (SXT) |
| Amoxicilina/ácido clavulánico (AMC) |
| Ceftriaxona (CRO) |
| Ciprofloxacina (CIP) |
| Estreptomina (S) |
| Imipenem |
| Ampicilina (AM) |
| Gentamicina (CN) |
| Kanamicina (K) |

Elaborado por: Adriana Almendariz, 2017



Imagen 12-2: Antibiograma

Fuente: Adriana Almendariz, 2017

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

Los valores que se presentarán a continuación muestran todos los resultados obtenidos en los análisis realizados en las aguas del Parque de las Fuentes del Cantón Guano, perteneciente a la provincia de Chimborazo, en donde se recolectaron muestras de dos sitios seleccionados. (A, y B)

3.1 Resultados de la medición de los Parámetros In Situ

Tabla 1-3: Determinación de los valores de pH y temperatura

| Parámetro | VALOR | | PROMEDIO |
|-----------------------------|---------|---------|----------|
| | Sitio A | Sitio B | |
| Temperatura °C (muestra) | 16.5 | 17 | 16.75 |
| pH | 7 | 7 | 7 |
| Temperatura ambiente °C | 8 | | |

Elaborado por Adriana Almendariz, 2017

Las fuentes de agua presentan propiedades fisicoquímicas según su composición química y las acciones externas de la naturaleza, estas propiedades pueden variar en el tiempo y el espacio. (PORRAS, et al., 1985)

En la tabla 1-3 se observan los valores obtenidos al medir los parámetros *in-situ*, del sitio A y B del parque de las Fuentes, teniendo una temperatura promedio del ambiente de 8°C y una temperatura promedio del agua (muestra) de 16.75°C; se cumple lo indicado por (BURBANO, et al., 2015) según lo cual el agua será considerada termal cuando tenga una temperatura superior en al menos 5°C a la temperatura media anual del lugar en el que se encuentra. Tomando en cuenta que la temperatura ambiente fue de 8°C debido a las frías condiciones climáticas que nos encontrábamos en aquellos días.

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

En la tablas 1-3, se observa el valor promedio de pH el cual fue 7, (MADIGAN, 2015) dice que cada especie bacteriana posee un pH óptimo de crecimiento, la mayoría de bacterias crecen a un pH entre 5.5 y 8, por lo tanto en esta fuente pueden desarrollarse gran variedad de microorganismos. (MADIGAN, 2015)

Tanto el pH como la temperatura afectan al desarrollo bacteriano. (NUÑES, Claudia. et al, 2004) Indica que a una temperatura baja se inhibe el crecimiento, y mientras más aumenta esta, el crecimiento también lo hace hasta encontrar una temperatura óptima de crecimiento, la que si se sobrepasa provoca la muerte.. Por lo tanto en estas fuentes de agua pueden encontrarse una gran variedad de microorganismos.(NUÑES, Claudia. et al, 2004)

3.2 Recuento de bacterias Aerobias Mesófilas

Luego de haber inoculado las placas 3M Petrifilm Recuento Rápido de Aerobios con cada una de las muestras de agua y posteriormente incubadas a 35°C se obtuvieron los resultados que se muestran en la tabla 2-3.

Tabla 2-3: Recuento de Bacterias Aerobias Mesófilas

| Lugar de Muestreo | | Unidades Formadoras de Colonias UFC/mL | Media | Varianza | Desviación Estándar |
|-------------------|----|--|--------------|--------------|---------------------|
| Ojo de agua A | M1 | 11 | 7 | 32 | 5,656854249 |
| | M2 | 3 | | | |
| Ojo de agua B | M1 | 100 | 101,5 | 4,5 | 2,121320344 |
| | M2 | 103 | | | |
| TOTAL | | 217 | 54,25 | 18,25 | 3,889087297 |

Elaborado por: Adriana Almendariz, 2017



Gráfica 1-3: Porcentaje de Bacterias Aerobias Mesófilas

Elaborado por: Adriana Almendariz, 2017

Las fuentes de agua poseen dos grupos de microorganismos un grupo formado por bacterias autóctonas dependientes de las propiedades fisicoquímicas del agua como la composición, temperatura, pH, nutrientes, oxigenación, y otro grupo conformado por bacterias alóctonas procedentes del suelo, vegetales, aguas residuales, heces fecales, etc; el contenido bacteriano varía en relación al tipo de agua, cantidad de sales inorgánicas, sustancias orgánicas, enturbiamiento y temperatura. (DE LA ROSA, 2000)

En las fuentes de agua la contaminación ocurre por la presencia de tierra, vegetación, heces de animales, y principalmente por los microorganismos que pueden o no ser patógenos, que el usuario deja al sumergirse en el agua, por lo cual se utilizan a los aerobios mesófilos como uno de los indicadores de la calidad del agua.

En la tabla 2-3 y en la gráfica 1-3 se puede observar que existió un total de 217 UFC/mL en los sitios muestreados (A y B), el menor crecimiento de bacterias fue en el sitio A donde se obtuvo una media de 7 UFC/mL representando el 6% del total de bacterias, en el sitio B se obtuvo una media de 101,5 UFC/mL representando el 94% del total de bacterias, tomando en cuenta que cuando se realizó el muestreo no hubo presencia de usuarios en el lugar.

La presencia de bacterias aerobias mesófilas en todos los puntos muestreados nos indica que las mismas pueden provenir del ambiente en particular de los usuarios y animales, vegetación, tierra, etc; sin embargo se debería tomar alguna medida de higiene adicional que disminuya la

cantidad de estos microorganismos especialmente en el sitio de muestreo B en donde se evidencia una cantidad mayor de microorganismos.

(ANDUEZA, 2014) menciona que la presencia de bacterias aerobias mesófilas en cantidades elevadas muestra la existencia de contaminación y problemas en la higiene del agua; de acuerdo al Código Sanitario Mexicano el cual indica que el número de aerobios mesófilos no debe sobrepasar 200 UFC/mL, ésta fuente no presentaría riesgo sanitario, puesto que presenta una media de 54.25 UFC/mL como se muestra en la tabla 2-3, lo cual indica que se encuentra dentro del rango establecido según el Código Sanitario Mexicano para bacterias aerobios mesófilos.

(OCAÑA, 2015), en un estudio realizado en las aguas termomedicinales del Parque Acuático Los Elenes, cantón Guano cita una media de 41.75 UFC/mL de bacterias aerobias mesófilas, que comparando con este estudio realizado en el parque de las Fuentes se presenta una media de 54.25 UFC/mL de bacterias aerobias mesófilas.

3.3 Recuento de bacterias *Escherichia coli* y Coliformes

Los coliformes son bacterias que se encuentran de manera natural en suelo y plantas y por lo general no causan daño, mientras que la *Escherichia coli*, es una bacteria que se encuentra en el intestino de animales y su presencia en agua indica contaminación fecal, por lo tanto, este tipo de bacterias son consideradas patógenas e indican que existe un elevado riesgo sanitario. (PRESCOTT, 2002)

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

Tabla 3-3: Recuento de *coliformes*

| Lugar de Muestreo | | Unidades Formadoras de Colonias UFC/mL | Media | Varianza | Desviación Estándar |
|-------------------|----|--|--------------|----------------|---------------------|
| | | Coliformes | | | |
| Sitio A | M1 | 2 | 1,5 | 2 | 1,41421356 |
| | M2 | 1 | | | |
| Sitio B | M1 | 65 | 32,5 | 2112,5 | 45,9619408 |
| | M2 | 0 | | | |
| TOTAL | | 67 | 16,75 | 1057,25 | 23,6880772 |

Elaborado por: Adriana Almendariz, 2017



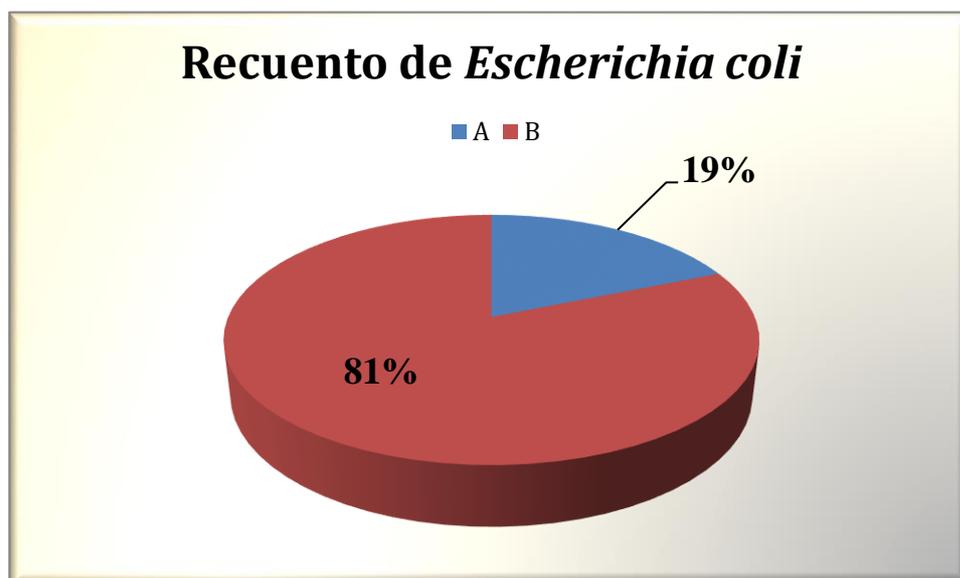
Gráfica 2-3: Porcentaje de *coliformes*

Elaborado por: Adriana Almendariz, 2017

Tabla 4-3: Recuento de *Escherichia coli*

| Lugar de Muestreo | | Unidades Formadoras de Colonias UFC/mL | Media | Varianza | Desviación Estándar |
|-------------------|----|--|----------|-------------|---------------------|
| | | <i>E.coli</i> | | | |
| Sitio A | M1 | 2 | 1,5 | 0,5 | 0,70710678 |
| | M2 | 1 | | | |
| Sitio B | M1 | 12 | 6,5 | 60,5 | 7,77817459 |
| | M2 | 1 | | | |
| TOTAL | | 16 | 4 | 30,5 | 4,24264069 |

Elaborado por: Adriana Almendariz, 2017



Gráfica 3-3: Porcentaje de *Escherichia coli*

Elaborado por: Adriana Almendariz, 2017

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

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

En cuanto al recuento de coliformes de la fuente como se muestra en la tabla 3-3 y gráfica 2-3, se puede observar que se obtuvo un total de 67 UFC/mL, con una media de 16,75 en los muestreos de los dos sitios (A y B), en el sitio A se obtuvo una media de 1 UFC/mL que representa el 2% del total de bacterias, mientras que en el sitio B se obtuvo una media de 32,5 UFC/mL representando el 98% del total de bacterias.

La presencia de *Escherichia coli* en el agua es un indicativo de contaminación reciente ya sea con aguas residuales o con residuos de animales. Es importante tener en cuenta que *E. coli* y los residuos de animales y humanos pueden entrar en el agua de muchas maneras diferentes; por ejemplo, durante la lluvia, probablemente de las heces de la fauna silvestre, animales domésticos y humanos que se encuentran a los alrededores de la fuente, fauna silvestre entre

otros. Las fuentes de contaminación fecales de humanos y animales representan un grave riesgo para la salud debido a la alta probabilidad de la existencia de agentes patógenos en los residuos fecales. (CHANNAH ROCK & BERENISE RIVERA, 2004)

En la tabla 4-3 y en la gráfica 3-3 se puede observar que existió un total de 16 UFC/mL en los sitios muestreados (A y B) con una media de 4 UFC/mL, en el sitio A existió un mínimo crecimiento de *E.coli* obteniendo una media de 1,5 UFC/mL lo que representa el 19% del total de bacterias, mientras que en el sitio B existió un mayor crecimiento con una media de 6,5 UFC/mL representando así el 81% del total de bacterias.

Prescott, menciona que la *E. coli* es una bacteria que se localiza en el intestino de animales y su presencia en agua indica contaminación fecal, este tipo de bacterias son consideradas patógenas e indican que existe un elevado riesgo sanitario. (PRESCOTT, et al, 2002, p 704). La presencia de *E.coli* en el Parque de las Fuentes es un indicativo de que dichas aguas nos son aptas para consumo humano.

3.4 Recuento de *Staphylococcus aureus*

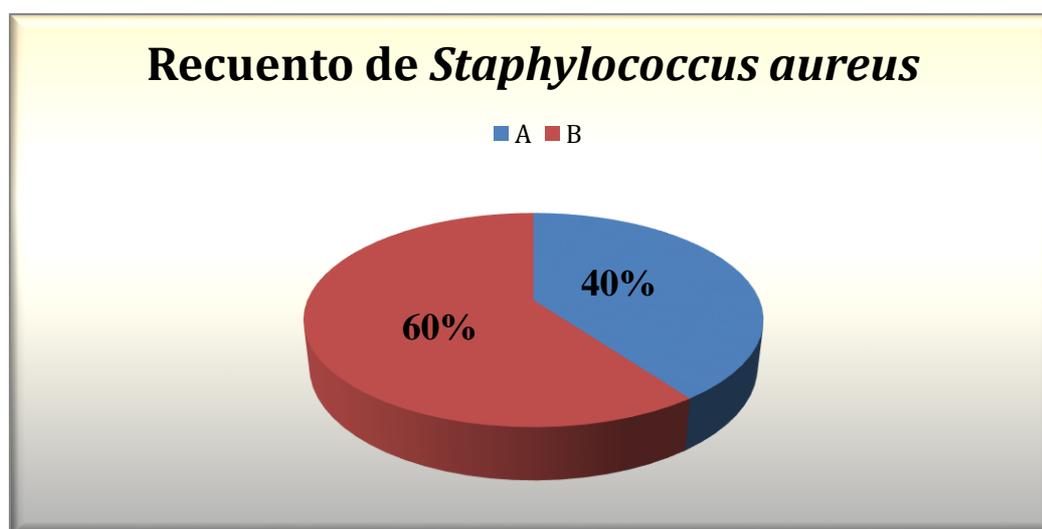
El *Staphylococcus aureus* es un microorganismo que produce enzimas como las hemolisinas (alfa, beta, gamma), nucleasas, proteasas, lipasas, hialuronidasa y colagenasa que degradan los tejidos locales del huésped para convertirlos en nutrientes para las bacterias, toxinas como la del síndrome del shock tóxico (TSST-1), enterotoxinas estafilocócicas (SE) que afecta el tracto gastrointestinal, toxinas exfoliativas (ETA y ETB) entre otras que ponen en riesgo la salud de las personas. (BUSTOS, 2006)

El recuento del número de colonias de *Staphylococcus aureus* se realizó mediante el método de Petrifilm, usando placas Staph express, las cuales fueron sembradas colocando 1mL de muestra en la placa y posteriormente incubadas a 35°C, por 48 horas, obteniendo los resultados que se muestran en la tabla 5-3.

Tabla 5-3: Recuento de *Staphylococcus aureus*

| Lugar de Muestreo | | Unidades Formadoras de Colonias UFC/mL | Media | Varianza | Desviación Estándar (S) |
|-------------------|----|--|-------------|-------------|-------------------------|
| Sitio A | M1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| | M2 | 1 | | | |
| Sitio B | M1 | 3 | 1,5 | 4,5 | 2,121320344 |
| | M2 | 0 | | | |
| TOTAL | | 5 | 1,25 | 2,25 | 1,060660172 |

Elaborado por: Adriana Almendariz, 2017



Gráfica 4-3: Porcentaje de *Staphylococcus aureus*

Elaborado por: Adriana Almendariz

El *Staphylococcus aureus* a pesar de formar parte de la microbiota normal de las personas (fosas nasales, piel, perineo, axilas y vagina) puede resultar patógeno en personas hospitalizadas, inmuno comprometidas, personas con heridas en la piel, infecciones, diabetes mellitus, artritis reumatoidea y enfermedades crónicas a las cuales les ocasiona desde enfermedades leves (infecciones de la piel y mucosas) hasta enfermedades de riesgo vital (osteomielitis, meningitis, endocarditis, neumonía, etc.) (BUSTOS, 2006)

En la tabla 5-3 se puede observar que existió un total de 5 UFC/mL de *Staphylococcus aureus* con una media de 1,25 en los sitios A y B, en el sitio A se obtuvo una media de 1 UFC/mL representando el 40% del total de bacterias, mientras que en el sitio B se obtuvo una media de 1,5 UFC/mL representando el 60% del total de bacterias.

En un estudio realizado por (OCAÑA, 2015), en las aguas termomedicinales de Los Elenes, cantón Guano, cita una media de 4 UFC/mL de *Staphylococcus aureus*, lo cual está por encima de los resultados obtenidos en este análisis indicado en el parque de las Fuentes.

De acuerdo a MacFaddin, el género *Staphylococcus* crece en ambientes salinos, debido al crecimiento que se produjo en los dos sitios muestreados (A y B) se puede decir que el agua del parque de las Fuentes puede tener sales que permitan el desarrollo de estas bacterias, y por ende va a ayudar en el crecimiento de *Staphylococcus*. (MACFADDIN, 2003)

3.5 Recuento de Mohos y Levaduras

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

Para determinar el número de colonias de mohos y levaduras presentes en las muestras recolectadas, se usó el método de placa Petrifilm, cuyos resultados obtenidos se muestran en la tabla 6-3.

Tabla 6-3: Recuento de Mohos y Levaduras

| Lugar de Muestreo | | Unidades Formadoras de Colonias UFC/mL | | | Media | Varianza | Desviación Estándar(S) |
|-------------------|----|--|-----------|-----------|-------------|-------------|------------------------|
| | | Mohos | Levaduras | Total | | | |
| Sitio A | M1 | 2 | 5 | 7 | 6 | 2 | 1,414213562 |
| | M2 | 1 | 4 | 5 | | | |
| Sitio B | M1 | 1 | 3 | 4 | 3,5 | 0,5 | 0,707106781 |
| | M2 | 2 | 1 | 3 | | | |
| TOTAL | | 6 | 13 | 19 | 4,75 | 1,25 | 1,060660172 |

Elaborado por: Adriana Almendariz, 2017



Gráfica 5-3: Porcentaje del Recuento de Mohos y Levaduras

Elaborado por: Adriana Almendariz, 2017

Los resultados de la tabla 6-3 muestran que existió una escasa presencia de mohos y levaduras en las muestras de agua del Parque de las Fuentes, se detectó en total 13 UFC/mL de levaduras y 6 UFC/mL de mohos en los dos sitios muestreados (A y B); en el sitio A se obtuvo una media de 6 UFC/mL de mohos y levaduras representando el 30% del total de bacterias, en el sitio B se obtuvo una media de 3,5 UFC/mL representando el 70% del total de bacterias.

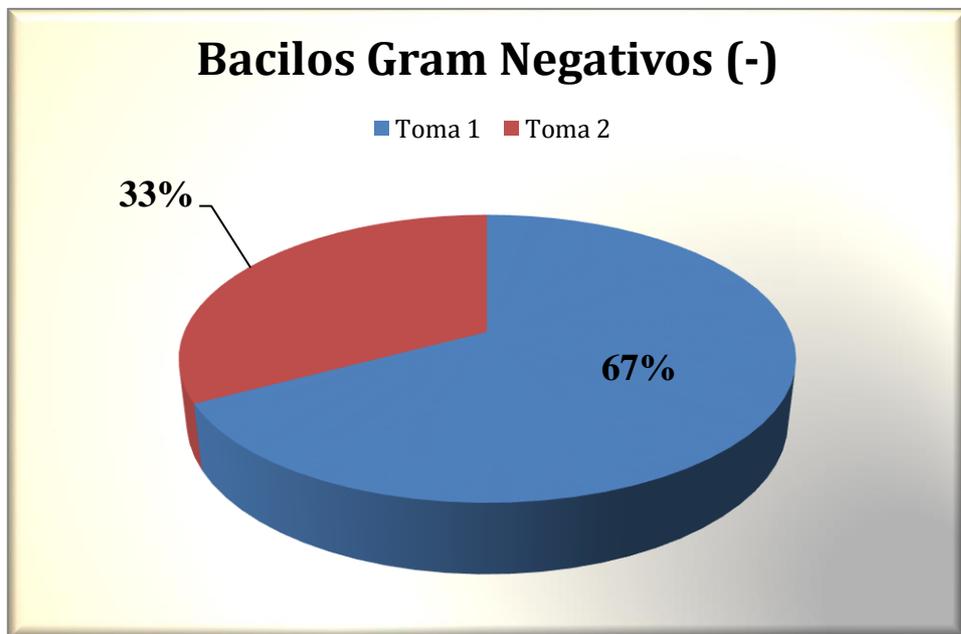
En un estudio realizado por María Campoverde y Fanny González en el agua de la Parroquia Baños (Cuenca - Ecuador) encontraron 584 colonias entre mohos y levaduras de los cuales 433 fueron de levaduras y 151 mohos, (CAMPOVERDE & GONZÁLEZ, 2012, p.1,2), en esta investigación se encontró 13 UFC/mL de levaduras y 6 UFC/mL de mohos, como se evidencia existe mayor número de levaduras y menor número de mohos en comparación al número encontrado en la investigación realizada en la parroquia Baños. (CAMPOVERDE T., María J., & GONZALES M., Fanny E., 2012)

3.6 Número de clones aislados en el Parque de las Fuentes

Tabla 7-3: Número de clones aislados en el parque de las Fuentes

| Bacteria | | Toma 1 (UFC/mL) | Toma 2 (UFC/mL) | Media | Varianza | Desv. Estándar | % |
|-------------|------------|--------------------|--------------------|-------|----------|-------------------|------|
| Gram (-) | Bacilos | 43 | 21 | 32 | 242 | 15,5563492 | 100% |
| | Cocos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0% |
| | Diplococos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0% |
| Gram (+) | Bacilos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0% |
| | Cocos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0% |
| | Diplococos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0% |

Elaborado por: Adriana Almendariz, 2017



Gráfica 6-3: Porcentaje del Número de clones aislados en el parque de las Fuentes

Elaborado por: Adriana Almendariz, 2017

En la tabla 7-3 se muestran los resultados de la evaluación por tinción Gram para los 64 clones que fueron aislados en el parque de las Fuentes, existiendo únicamente la presencia de microorganismos Bacilos Gram negativos con un (100%), encontrándose en la primera toma un total de 43 clones bacilos Gram negativos que representa el 67%, mientras tanto que en la segunda toma se encontraron 21 clones bacilos Gram negativos representando el 33%.

En esta investigación se observa que todas las cepas aisladas en el parque de las Fuentes corresponden a bacilos Gram negativos, 100% (64 bacterias), datos que no coinciden con otros análisis realizados en varios manantiales termales de España, como lo menciona Flores en su trabajo, donde cita que los manantiales de Santa Apolonia, La Mitisús y Concepción Vilatoya

tienen una población microbiana compuesta por un mayor porcentaje de bacterias Gram negativas con un 88,33% y un menor porcentaje de Gram positivas. (FLORES, Sandra. 2013. p. 73). Demostrando que la microbiota propia de este tipo de manantiales está constituida principalmente por bacilos Gram negativos.(FLORES, 2013)

Para continuar con el trabajo se seleccionaron 20 clones representativos de todos los aislados para continuar con su estudio e identificación.

3.7 Morfología macroscópica de las colonias bacterianas que fueron selecciones obtenidas del Parque de las Fuentes

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

Tabla 8-3: Descripción macroscópica de los clones aislados

| Morfología Macroscópica (Bacilos Gram Negativos) | | | | | | | | |
|--|-----------|---------|-------------|-----------|------------|-------------|--------------|-------------|
| Clon | Petrifilm | Forma | Borde | Elevación | Superficie | Color | Consistencia | Tamaño (mm) |
| 2.1- 8 CLON 1 | EC | Redonda | Entero | Elevada | Lisa | Amarillenta | Cremosa | 3 |
| 2.2 -38 CLON 2 | AC | Redonda | Entero | Cóncava | Lisa | Crema | Cremosa | 3 |
| 2.2- 43 CLON 3 | AC | Redonda | Entero | Cóncava | Lisa | Amarillenta | Cremosa | 3 |
| 5-15 CLON 4 | STX | Redonda | Entero | Cóncava | Lisa | Crema | Cremosa | 4 |
| 5-19 CLON 5 | EC | Redonda | Filamentoso | Cóncava | Lisa | Hueso | Cremosa | 4 |
| 3-15 CLON 6 | STX | Redonda | Entero | Cóncava | Lisa | Amarillenta | Cremosa | 5 |
| 3-28 CLON 7 | STX | Redonda | Entero | Cóncava | Lisa | Amarillenta | Cremosa | 5 |
| 3-11 CLON 8 | STX | Redonda | Entero | Cóncava | Lisa | Amarillenta | Cremosa | 4 |
| 1.1-11 CLON 9 | EC | Redonda | Entero | Cóncava | Lisa | Amarillenta | Cremosa | 4 |
| 1.1-13 CLON 10 | EC | Redonda | Entero | Cóncava | Lisa | Amarillenta | Cremosa | 3 |
| 1.1-19 CLON 11 | EC | Redonda | Entero | Cóncava | Lisa | Amarillenta | Cremosa | 4 |
| 1.1-21 CLON 12 | EC | Redonda | Entero | Cóncava | Lisa | Crema | Cremosa | 3 |
| 1.1-23 CLON 13 | EC | Redonda | Entero | Cóncava | Lisa | Amarillenta | Cremosa | 3 |
| 1-6 CLON 14 | EC | Redonda | Entero | Elevada | Lisa | Crema | Cremosa | 3 |
| 1-15 CLON 15 | EC | Redonda | Entero | Cóncava | Lisa | Hueso | Cremosa | 3 |
| 1-34 CLON 16 | AC | Redonda | Entero | Elevada | Lisa | Crema | Cremosa | 4 |
| 1-30 CLON 17 | AC | Redonda | Entero | Elevada | Lisa | Crema | Cremosa | 4 |
| 1-41 CLON 18 | AC | Redonda | Entero | Cóncava | Lisa | Crema | Cremosa | 3 |
| 2-19 CLON 19 | AC | Redonda | Entero | Cóncava | Lisa | Crema | Cremosa | 3 |
| 2-38 CLON 20 | AC | Redonda | Filamentoso | Cóncava | Lisa | Crema | Cremosa | 4 |

Elaborado por: Adriana Almendariz,2017

AC: Petrifilm para Aerobios; EC: Petrifilm para *E coli*/ Coliformes; STX: Petrifilm para *Staphylococcus aureus*.

En la tabla 8-3 se muestra la descripción macroscópica de los 20 clones puros que se obtuvieron en las aguas del parque de la Fuentes, estos clones fueron aislados de las colonias de las placas Petrifilm de *E. coli*/coliformes (EC), Aerobios (AC) y *Staphylococcus aureus* (STX); tomando en cuenta el sitio de muestreo y las características que presentaban en las placas petrifilm.

La morfología macroscópica de los clones mostró que: el 100% fueron redondas (20) 100%; de bordes filamentosos (2) 10% y enteros (18) 90%; con elevación un (4) 20% y no presentan elevación cóncava (16) un 80%; la superficie de estas bacterias es lisa (20) en un 100%; en cuanto a su color presentan coloraciones amarillentas (9) 45%, coloración cremosa (9) 45% y un color hueso (2) 10%; su consistencia es cremosa en su totalidad, es decir, el 100% de los clones obtenidos; y finalmente el tamaño varía de 3mm a 5mm, las colonias de 3mm (10) corresponde al 50%, las de 4mm (8) corresponde al 40%, las de 5mm (2) corresponde al 10%.

De acuerdo a esta evaluación macroscópica la morfología predominante de las bacterias de las aguas del parque de las Fuentes son de forma redonda, con bordes enteros sin elevación, con una superficie lisa, de consistencia cremosa, de coloración amarillenta, y con un tamaño de 3mm aproximadamente.

3.8 Resultados de las pruebas bioquímicas de los clones aislados

Tabla 9-3: Pruebas bioquímicas de los clones aislados – Bacilos Gram Negativos

| Código (Clon) | Petrifilm | Catalasa | Oxidasa | Pruebas Bioquímicas | | | | | | | | | | E.M.B | MacConkey | S-S | O.F | | Movilidad | Bacteria |
|-------------------|-----------|----------|---------|---------------------|---|---|---|-----|---|---|---------|------|-----|-------|-----------|-----|-----|---|-----------|-----------------------|
| | | | | Kligler | | | | SIM | | | Citrato | Urea | Con | | | | Sin | | | |
| | | | | G1 | L | G | H | In | M | H | | | | | | | | | | |
| 2.1-8 CLON 1 | EC | + | - | + | + | - | - | - | + | + | - | + | + | SC | SC | - | - | - | + | <i>E.cloacae</i> |
| 2.2-38 CLON 2 | AC | + | - | + | + | + | - | + | + | - | - | - | - | SC | C | - | + | + | + | <i>E. coli</i> |
| 2.2-43 CLON 3 | AC | + | - | + | + | + | - | + | + | - | - | - | - | SC | C | - | + | + | + | <i>E.coli</i> |
| 5-15 CLON 4 | STX | + | + | + | + | - | - | - | + | - | + | + | + | SC | SC | - | - | - | + | <i>K. pneumoniae.</i> |
| 5-19 CLON 5 | EC | + | - | + | + | + | - | + | + | - | - | - | - | SC | C | - | + | + | + | <i>E. coli</i> |
| 3-15 CLON 6 | STX | + | + | + | + | - | - | - | + | - | + | + | + | SC | SC | - | - | - | + | <i>K. pneumoniae</i> |
| 3-28 CLON 7 | STX | + | - | + | + | + | - | + | + | - | - | - | - | SC | C | - | + | + | + | <i>E.coli</i> |
| 3-11 CLON 8 | STX | + | - | + | + | + | - | + | + | - | - | - | - | SC | SC | - | + | + | + | <i>E. cloacae</i> |
| 1.1-11 CLON 9 | EC | + | - | + | + | - | - | - | + | - | + | + | + | SC | SC | - | - | - | + | <i>E.cloacae</i> |
| 1.1-13 CLON 10 | EC | + | - | + | + | + | - | + | + | - | - | - | - | SC | C | - | + | + | + | <i>E. coli</i> |
| 1.1-19 CLON 11 | EC | + | - | + | + | + | - | + | + | - | - | - | - | SC | C | - | + | + | + | <i>E.coli</i> |
| 1.1-21 CLON 12 | EC | + | - | + | + | + | - | + | + | - | - | - | - | SC | C | - | + | + | + | <i>E coli</i> |
| 1.1-23 CLON 13 | EC | + | - | + | + | - | - | - | + | - | + | + | + | SC | C | - | - | - | + | <i>E cloacae</i> |
| 1-6 CLON 14 | EC | + | - | + | + | + | - | + | + | - | - | - | - | SC | C | - | + | + | + | <i>E. coli</i> |
| 1-15 CLON 15 | EC | + | - | + | + | + | - | + | + | - | - | - | - | SC | C | - | + | + | + | <i>E. coli</i> |
| 1-34 CLON 16 | AC | + | - | + | + | + | - | + | + | - | - | - | - | SC | C | - | + | + | + | <i>E.coli</i> |
| 1-30 CLON 17 | AC | + | - | + | + | + | - | + | + | - | - | - | - | SC | C | - | + | + | + | <i>E. coli</i> |
| 1-41 CLON 18 | AC | + | - | + | + | - | - | - | + | - | + | + | + | SC | SC | - | - | - | + | <i>E. cloacae</i> |
| 2-19 CLON 19 | AC | + | - | + | + | + | - | + | + | - | - | - | - | SC | C | - | + | + | + | <i>E.coli</i> |
| 2-38 CLON 20 | AC | + | - | + | + | + | - | + | + | - | - | - | - | SC | C | - | + | + | + | <i>E.coli</i> |

Elaborado por: Adriana Almendariz, 2017

AC: Petrifilm para Aerobios; EC: Petrifilm para *E. coli*/ Coliformes; STX: Petrifilm para *Staphylococcus aureus*.

G: Glucosa; L: Lactosa; Mov: Movilidad; E.M.B: Eosina azul de metileno; S-S: Salmonella-Shigella; SC: Sin crecimiento; C: Crecimiento.

En la tabla 18-3 se pueden observar los resultados de las pruebas realizadas para confirmar el género y especie de los 20 clones puros obtenidos.

Los resultados obtenidos para las pruebas bioquímicas de los clones 2,3,5,7,10,11,12,14,15,16,17,19,y 20 indica que pertenecen a *Escherichia coli*, esta bacteria es bacilo Gram Negativo no esporulado, no tiene movilidad y si lo tiene es por flagelos peritricos, anaerobios facultativos, oxidasa negativa, fermentan glucosa y lactosa; mientras que (ÁLVAREZ, & BOQUET, 1990, p. 74), mencionan que estas bacterias fermentan glucosa y lactosa, producen gas, no producen ácido sulfhídrico, citrato y urea negativos, indol positivo y de movilidad variable, crecen en E.M.B y MacConkey y O.F positivo, el 100% de las bacterias coinciden con bibliografía. (ÁLVAREZ, 1990)

La presencia de esta bacteria en el parque de “Las Fuentes” puede deberse a que este sitio se encuentra en una zona abierta sin protección, los usuarios lo utilizan para uso personal y para lavar ropa, existiendo también en el lugar el pastoreo de animales (ovinos); todos estos se convierten en agentes causantes de la contaminación de dichas fuentes.

Los clones 1,8,9,13,y 18 corresponden al género *Enterobacter* y particularmente a la especie *Enterobacter cloacae* es un bacilo Gram negativo oxidasa negativo , catalasa positivo que se encuentra en el aparato digestivo del ser humano. (ÁLVAREZ, & BOQUET, 1990) menciona que esta bacteria fermenta glucosa y lactosa, no existe producción de gas, indol negativo y de movilidad positivo, el 100 % de las bacterias coinciden con bibliografía. (ÁLVAREZ, 1990)

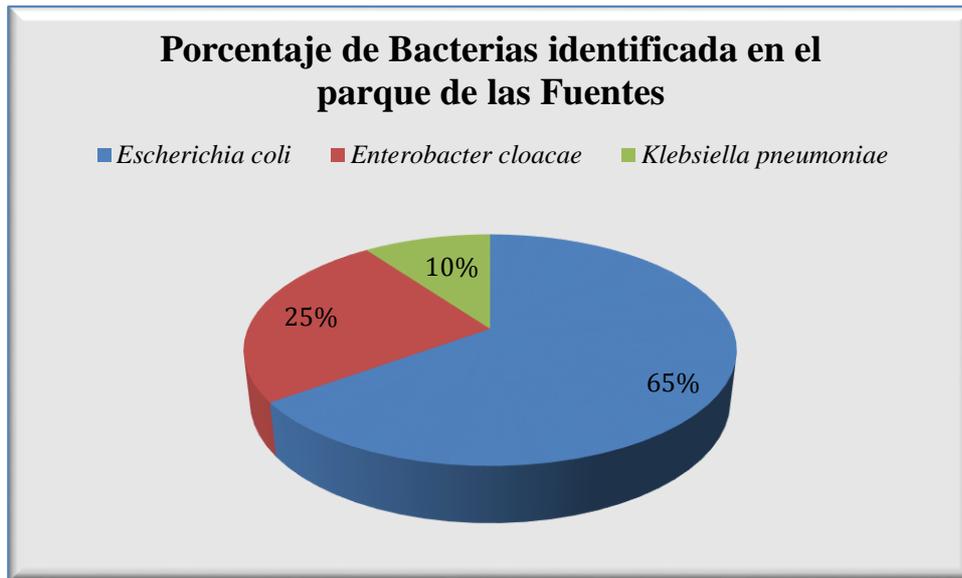
Los clones 4 y 6 corresponden a la familia *Enterobacteriaceae* de género y especie *Klebsiella pneumoniae*, es una bacteria Gram negativa en forma de varilla no móvil, según (ÁLVAREZ, & BOQUET, 1990), presenta oxidasa y catalasa positiva, fermentador de glucosa y lactosa, sin presencia de gas, indol negativo, movilidad positivo que comparado con bibliografía coincide con los resultados obtenidos. (ÁLVAREZ, 1990)

3.9 Análisis de las bacterias identificadas en el parque de las Fuentes

Tabla 10-3: Análisis de las bacterias identificadas en el parque de las Fuentes

| Género | Especie | Clones | Porcentaje |
|---------------------|-------------------|--------|------------|
| <i>Escherichia</i> | <i>Coli</i> | 13 | 65% |
| <i>Enterobacter</i> | <i>Cloacae</i> | 5 | 25% |
| <i>Klebsiella</i> | <i>pneumoniae</i> | 2 | 10% |

Elaborado por: Adriana Almendariz, 2017



Gráfica 7-3: Porcentaje de bacterias identificadas en el parque de las Fuentes

Elaborado por: Adriana Almendariz, 2017

En la tabla 10-3 y la gráfica 7-3 se puede observar el porcentaje de bacterias identificadas en el parque de las Fuentes, en donde se observa que un 65% corresponde a *Escherichia coli*, 25% a *Enterobacter cloacae* y un 10% a *Klebsiella pneumoniae*.

Escherichia coli: ha sido tomado como índice de contaminación fecal, puesto que grandes cantidades de estas bacterias se encuentran en las heces de humanos y animales. La presencia de este patógeno en el agua indica que esta ha sufrido algún tipo de contaminación fecal produciendo un riesgo a la salud de los humanos; según la OMS este microorganismo se transmite por el consumo de agua o alimentos contaminados provocando una serie de trastornos en el cuerpo humano como diarrea, vomito, fiebre y cólicos. (PAMBABAY, 2015)

Enterobacter cloacae es un bacilo Gram negativo que puede producir infección en el tracto urinario, en heridas quirúrgicas y bacteriemias (infección en la sangre). A veces produce infecciones oportunistas, cuando disminuyen las defensas, y en otras ocasiones la infección es por contaminación externa.

Klebsiella Pneumoniae puede ocasionar hasta un 10% de las infecciones urinarias, fundamentalmente en pacientes con obstrucción de las vías urinarias, diabético o con antecedentes de antibioterapia previa no activa frente a este microorganismo. Es agente causante de bacteriemia nosocomial dentro de los bacilos Gram negativos después de *Echerichia Coli*. Los focos de origen más comunes son el tracto urinario, las vías respiratorias inferiores, el

tracto biliar, las infecciones de las heridas operatorias y los catéteres intravasculares. (NAVARRO, 2010)

3.10 Evaluación a la Resistencia de Antibióticos

3.10.1 Análisis de Antibiograma de clones aislados e identificados

La resistencia bacteriana a los antibióticos constituye una grave amenaza mundial pues al ser las bacterias multirresistentes impiden que la infección o enfermedad que ocasionaron responda adecuadamente al tratamiento, generando un padecimiento prolongado e incluso el riesgo de defunción, sumado a esto se incrementan los costos de atención sanitaria ya que debido a que la infección es resistente no es suficiente un tratamiento con medicamentos de primera línea sino que es necesario usar terapias costosas. (OMS, 2016)

Los resultados obtenidos para la identificación de los clones seleccionados, indican que la fuente está contaminada con bacterias enteropatógenas, lo cual indica la alta intervención humana que posee.

Tabla 11-3: Antibiograma de los clones Bacilos Gram Negativos del parque de las Fuentes

| # CLON | BACTERIA | ANTIBIÓTICOS | | | | | | | | |
|---------|------------------------------|--------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|-------------------|----------------------|---------------------|-----------------|-------------------|--------------------|
| | | Ceftriaxona (30µg) | Trimetoprim/sulfametoxazol (1.25µg) | Amoxicilina+Ac.Clavulánico (30/10µg) | Kanamicina (30µg) | Ciprofloxacina (5µg) | Estreptomina (10µg) | Imipenem (10µg) | Ampicilina (10µg) | Gentamicina (10µg) |
| CLON 1 | <i>Enterobacter cloacae</i> | S | S | S | R | S | S | S | S | S |
| CLON 2 | <i>Escherichia coli</i> | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| CLON 3 | <i>Escherichia coli</i> | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| CLON 4 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| CLON 5 | <i>Escherichia coli</i> | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| CLON 6 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| CLON 7 | <i>Escherichia coli</i> | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| CLON 8 | <i>Enterobacter cloacae</i> | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| CLON 9 | <i>Enterobacter cloacae</i> | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| CLON10 | <i>Escherichia coli</i> | S | S | S | S | S | S | R | S | R |
| CLON11 | <i>Escherichia coli</i> | S | S | S | S | S | S | R | S | R |
| CLON12 | <i>Escherichia coli</i> | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| CLON 13 | <i>Enterobacter cloacae</i> | S | S | S | R | S | S | S | S | S |
| CLON 14 | <i>Escherichia coli</i> | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| CLON 15 | <i>Escherichia coli</i> | S | S | S | S | S | S | R | S | R |
| CLON 16 | <i>Escherichia coli</i> | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| CLON 17 | <i>Escherichia coli</i> | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| CLON 18 | <i>Enterobacter cloacae</i> | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| CLON 19 | <i>Escherichia coli</i> | S | S | S | S | S | S | R | S | R |
| CLON 20 | <i>Escherichia coli</i> | S | S | S | S | S | S | S | S | S |

Elaborado por: Adriana Almendariz 2017

S: Sensible; R: Resistente

Los resultados obtenidos en la presente investigación indican que en regla general existe un bajo nivel de resistencia a antibióticos en los clones aislados, notándose que la bacteria con mayor resistencia fue la *Escherichia coli*, con 38,46% (5clones) resistentes a los antibióticos Imipenem y Gentamicina; seguido por *Enterobacter cloacae*, con un 40% (2clones) presentando resistencia a la Kanamicina.

Clara Varela en el 2007, en un estudio realizado menciona que existe resistencia de *Escherichia coli* frente a Imipenem y Gentamicina, lo cual concuerda con el clon 10,11 y 15 de esta

investigación. El imipenem es un antibiótico beta-lactámico derivado de la tienamicina; actúa inhibiendo la síntesis de la pared bacteriana en varias bacterias gram-negativas, es estable en presencia de betalactamasas (penicilinas y cefalosporinas) producidas por diferentes bacterias. Actúa como potente inhibidor de betalactamasas de bacterias gram-negativas que son resistentes a la mayoría de antibióticos betalactámicos. Su efecto neto se considera bactericida. (VARELA ALONSO, 2007)

La gentamicina es un aminoglucósido, se emplea como antibiótico para erradicar infecciones contra bacterias sensibles, sirve para tratar diversas enfermedades graves de piel, pulmón, estómago, vías urinarias y sangre; su uso está indicado cuando la administración de otros antibióticos menos potentes haya sido ineficaz. (VARELA ALONSO, 2007)

Los clones 1 y 13 de género y especie *Enterobacter cloacae* presentan resistencia únicamente a la Kanamicina y al resto de antibióticos usados son sensibles, lo cual no concuerda con esta investigación debido a que todas las enterobacterias presentan, por su baja permeabilidad de membrana externa, resistencia a penicilina, oxazolidinona, (Oxacilina, cloxacilina, etc.), clindamicina, lincomicina, glicopéptidos (vancomicina y teicoplanina), y macrólidos. (VARELA ALONSO, 2007)

Al comparar los resultados del antibiograma de esta investigación con los resultados obtenidos en el análisis de la fuente el Ejido del cantón Guano, no concuerdan debido a que los clones de *Escherichia coli*, aislados en la fuente el Ejido, presenta multiresistencia a kanamicina, amoxicilina + ácido clavulánico, estreptomina, imipenem, ampicilina, y gentamicina (en el caso del clon 10). (TIERRA, 2017)

Escherichia coli, tiene altos porcentajes de resistencia hacia ampicilina, trimetoprim-sulfametoxazol, kanamicina, estreptomina, por lo cual genera complicaciones en el tratamiento de antibióticos, la resistencia antibiótica se debe a mutaciones a nivel cromosómico o transferencia horizontal de material genético. La resistencia a amoxicilina-ácido clavulánico es un indicador de resistencia a múltiples antibióticos. En general la mayor incidencia de resistencia se da en enterobacterias. (TIERRA, 2017)

CONCLUSIONES

El análisis microbiológico de las aguas del Parque de las Fuentes mostró un crecimiento de bacterias en todos los sitios de muestreo (sitio A y sitio B), aislándose 64 clones haciéndose notar que toda la microbiota aislada en el parque de las Fuentes corresponde a bacilos Gram negativos con un 100% .

De los clones aislados fueron identificados 20; 13 clones correspondieron a *Escherichia coli*, 5 clones a *Enterobacter cloacae*, y 2 clones a *Klebsiella pneumoniae*.

Desde el punto de vista sanitario, el agua del parque de las Fuentes presenta bacterias indicadoras de contaminación fecal (*Escherichia coli* 65%), y microorganismos patógenos (*Enterobacter cloacae* 25%, *Klebsiella pneumoniae* 10%), todos pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* y pueden causar infecciones agudas y/o graves en la población que hace uso de esta agua, por estas razones el agua del parque de las Fuentes no es apta para consumo humano.

La evaluación de la resistencia a antibióticos en el parque de las Fuentes mostró que en el caso de *Escherichia coli* los clones 10,11 y 15 presentaron resistencia a 2 antibióticos (Imipenem, Gentamicina), en el caso de *Enterobacter cloacae* el clon 1 y 13 presentó resistencia a 1 antibiótico (Kanamicina)

RECOMENDACIONES

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

Es necesario realizar evaluaciones de la fuente, en diferentes épocas del año, para determinar cómo varía la carga microbiana de la fuente.

Se recomienda al Gobierno Autónomo Descentralizado del Cantón Guano socializar estos resultados a la población que hace uso con el fin de dar a conocer y buscar soluciones para prevenir infecciones que pueden producirse por las bacterias encontradas en el agua del parque de las Fuentes; además se recomienda realizar análisis microbiológicos constantes para poder así controlar los parámetros de calidad.

BIBLIOGRAFIA

ÁLVAREZ, María & BOQUET, Ernesto. *Manual de Técnicas en Microbiología Clínica.* Segunda. Barcelona - España : Gráficas, 1990. págs. 74,128,130.

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

APELLA M, & ARAUJO, P. Microbiología de agua. Conceptos básicos pp. 33-48.[Consulta: 01 Diciembre 2015.]. Disponible en: http://www.psa.es/es/projects/solarsafewater/documents/libro/02_Capitulo_02.pdf.

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

BURBANO, Napoleón, et al. "La hidrogeología del Ecuador"*Aguas termominerales en el Ecuador.* [En línea] 2014. [Consulta: 23 Marzo 2017.]. Disponible en: <https://issuu.com/inamhi/docs/termalismo>.

BUSTOS, Jaime;et al.Hamdan. "*Staphylococcus aureus: la reemergencia de un patógeno en la comunidad*". México. 2006. pág. 288.

CABRERA AGUAYO, Pedro.Javier. *Evaluación Microbiológica de las aguas termales del balneario las Peñas, cantón Baños, provincia Tungurahua.* [En línea] (Tesis) (Pregrado) ESPOCH. Ciencias. Bioquímica y Farmacia. Riobamba-Ecuador 2015. pp. 8-66. [Consulta: 23 Marzo 2017.] Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/4633/1/56T00607%20UDCTFC.pdf>.

CAMACHO, A y Giles, et al. 2009. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos. [En línea] 2009. [Consulta: 30 de Marzo de 2017.]Disponible en: <https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=3&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjfysx5oXPAhWCJh4KHXhpDmkQFggwMAI&url=http%3A%2F%2>

Fdepa.fquim.unam.mx%2Famyd%2Farchivero%2FTecnicBasicas-Cuenta-mohos
levaduras_6530.pdf&usg=AFQjCNHfx8Sv8eAuUb5ww2bU.

CAMPOVERDE TOROMORENO, María José&GONZÁLEZ MIRANDA, Fanny Esther.

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

DE LA ROSA M&MOSSO, M."Diversidad microbiana de las aguas minerales". Panorama actual de las Aguas Minerales y Minero-medicinales en España. n° 432000. España. pp 153-157.

EMB. 2010. EMB Agar. *Eosina Azul de Metileno*. [En línea] 2010. [Consulta: 09 de Marzo de 2017.] <http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/embarag.htm>.

FERNÁNDEZ, ÁNGELES Carbajal Azcona & María González. 2012. Propiedades y funciones biológicas del agua. [En línea] 2012. [Consulta: 21 de Marzo 2017.]. Disponible en: (<http://www.ucm.es/data/cont/docs/458-2013-07-24-Carbajal-Gonzalez-2012-ISBN-978-84-00-09572-7.pdf>).

FERNANDEZ, ANA. Métodos de Identificación bacteriana en el laboratorio. *Procedimientos en Microbiología Clínica*. [En línea] Madrid -España, 2010. [Consulta el: 21 de Marzo 2017.] Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf>.

FLORES, Sandra. Aislamiento, identificación y detección de microorganismos con actividades biológicas procedentes de las aguas de los manantiales termales LA MITISÚS y SANTA APOLONIA del estado de Mérida [En línea] (Tesis) (Maestría)Universidad de los Andes, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Mérida-Venezuela 2013. págs.5; 39; 71-97 161. [Consulta el: 21 de Marzo 2017.]. Disponible en: <http://javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis249.pdf>.

GAMAZO, Carlos. Manual Práctico de Microbiología. [En línea] Barcelona - España 3era ed., 2005. [Consulta: 02 de Diciembre de 2016.]. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=MfW3TuHL4gC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false.

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGÍA E HIDROLOGÍA INAMHI."La hidrogeología del Ecuador". *Hidrogeología en Ecuador*. [En línea], 2011. (Ecuador) 1 (1), pp. 2-7 [Consulta: 22 de Marzo 2017.] Disponible en: https://issuu.com/inamhi/docs/conferencihidrogeologia_en_ecuador.

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

MACAS LUZURIAGA, Patricia.Elizabeth. *Estudio Microbiológico de las Aguas Termominerales del Balneario "Santa Ana" de Baños de Agua Santa-Tungurahua*. [En línea] (Tesis) (Pregrado) ESPOCH. Ciencias. Bioquímica y Farmacia. Riobamba-Ecuador 2015. pp. 8-69. [Consulta: 22 Marzo 2016.] Disponible en: (<http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/4432/1/56T00560%20UDCTFC.pdf>).

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

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

NAVARRO, Zuleica del Carmén. *Enterobacterias antibioticoterapia*. [En línea] 2010. [Consulta: 30 de Marzo de 2017.]. Disponible en: http://www.sld.cu/galerias/doc/sitios/apua-cuba/enterobacterias_y_antibioticoterapia.

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

NUÑES, Claudia. et al. *La vida a altas*. México D.F - México : s.n., 2004, Vol. 55 (1) pp. 56-65,.

NÚÑEZ ALMEIDA, Sandra.Vanessa.*Estudio microbiológico de las aguas termomineromedicinales del balneario "El Salado" de Baños de Agua Santa-Tungurahua*. [En línea] (Tesis) (Pregrado)ESPOCH. Ciencias. Bioquímica y Farmacia. Riobamba-Ecuador.2015. pp. 15-39 [Consulta: 20 Marzo 2017.] Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/4399/1/56T00552%20UDCTFC.pdf>.

OCAÑA BONIFAZ, Evelyn.Patricia. *Estudio microbiológico de las aguas termomedicinales del parque acuático Los Elenes, cantón Guano, provincia Chimborazo.* [En línea] (Tesis) (Pregrado) ESPOCH. Ciencias. Bioquímica y Farmacia. Riobamba-Ecuador 2015. pp. 8-66. [Consulta: 22 Marzo 2017.] Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/4420/1/56T00557%20UDCTFC.pdf>.

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

PAMBABAY NARANJO, María Fernanda. *Estudio microbiológico de las aguas termales Reina del Rosario de Cununyacu, parroquia Pilahuintun Tungurahua.* [En línea] (Tesis) (Pregrado) ESPOCH. Ciencias. Bioquímica y Farmacia. Riobamba-Ecuador 2015. pp 12, 56 [Consulta: 22 Marzo 2017.]. Disponible en: <http://http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/4508/1/56T00572%20UDCTFC.pdfbitstream/123456789/4508/1/56T00572%20UDCTFC.pdf>.

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

PORRAS, Jorge&Nieto,et al. "Calidad y contaminación de las aguas subterráneas en España." [En línea] España, 1985. pp 67-189 [Consulta: 30 de Marzo de 2017.] Disponible en: <http://aguas.igme.es/igme/publica/libro43/lib43.htm>.

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

RECuento DE AEROBIOS. *Guía de Interpretación 3M™ Pertrifilm™ [En línea].* 2014. [Consulta: 22 Marzo 2017]. Disponible en: http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat.workshopmrama/files/Petrifilm_guias.pdf.

RECuento DE COLIFORMES. *Guía de Interpretación 3M™ Pertrifilm™ [En línea].* 2014. [Consulta: 21 Marzo 2017]. Disponible en: http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat.workshopmrama/files/Petrifilm_guias.pdf

RECUENTO DE MOHOS Y LEVADURAS. *Guía de Interpretación 3M™ Petrifilm™* [En línea]. 2014. [Consulta: 21 Marzo 2017]. Disponible en: http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat/workshopmrama/files/Petriefilm_guias.pdf.

RODÉS, B. et al. *Control de calidad de las aguas minero - medicinales.* Barcelona : s.n., 2001. págs. 75 -86.

SALUD, ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. *Guía para la Calidad de Agua Potable .* Tercera Edición. 2006. págs. 1-393.

TIERRA LLANGA, Fabricio.Segundo.*Evaluación de la calidad física, química y microbiológica del agua de consumo humano de la parroquia de San Luis, Cantón Riobamba, Provincia de Chimborazo.* [En línea] (Tesis) (Pregrado) ESPOCH. Ciencias. Bioquímica y Farmacia. Riobamba-Ecuador 2015. pp. 12-72. [Consulta: 22 Marzo 2017.] Disponible en: (<http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/4438/1/56T00562%20UDCTFC.pdf>).

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

VÁSQUEZ, Sylvia & Neill, et al. Importancia de los coliformes en los alimentos . [En línea] 2013. [Consulta: 30 de Marzo de 2017.] Disponible en : https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=8&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjyNyE0YPPAhVHXR4KHTnbBIMQFggMAc&url=http%3A%2F%2Fwww.montevideo.gub.uy%2Fsites%2Fdefault%2Ffiles%2Fimportancia_de_los_coliformes_en_los_alimentos.pdf&usg=AFQjCNEkz.

VEINTIMILLA ANDRADE, Ana.Vanesa. *"Estudio microbiológico de las aguas termales de Guayllabamba o Aguallanchí situadas en el cantón Chambo, provincia de Chimborazo" -* [En línea] (Tesis) (Pregrado) ESPOCH. Ciencias. Bioquímica y Farmacia. Riobamba-Ecuador 2015. pp. 12-69. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/4455/1/56T00566%20UDCTFC.pdf>.

ANEXOS

ANEXO A: Parque de las Fuentes



Fuente: Adriana Almendariz

ANEXO B: Medición de los parámetros in situ



Fuente: Adriana Almendariz

ANEXO C: Toma de muestras sitio A y B



Fuente: Adriana Almendariz

ANEXO D: Siembra por el método de Petrifilm en las muestras A y B

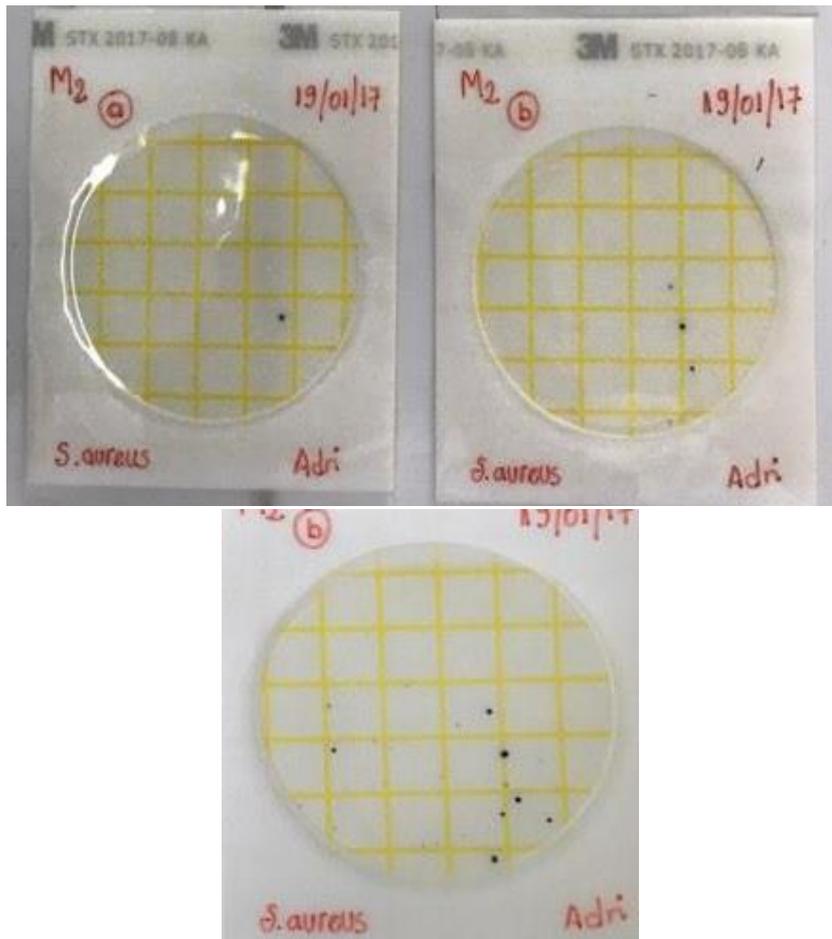


Fuente: Adriana Almendariz



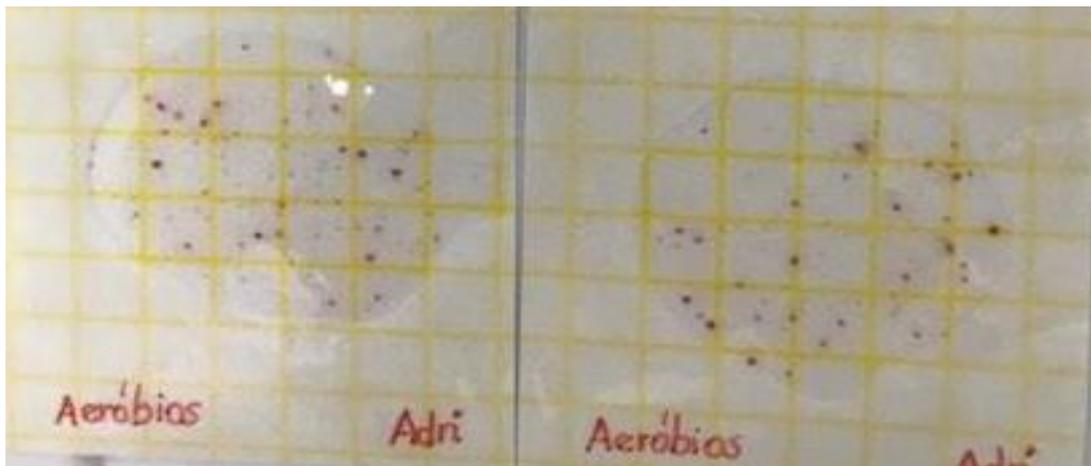
Fuente: Adriana Almendariz

ANEXO E: Placa de recuento de bacterias de *Staphylococcus aureus* de las muestras A y B



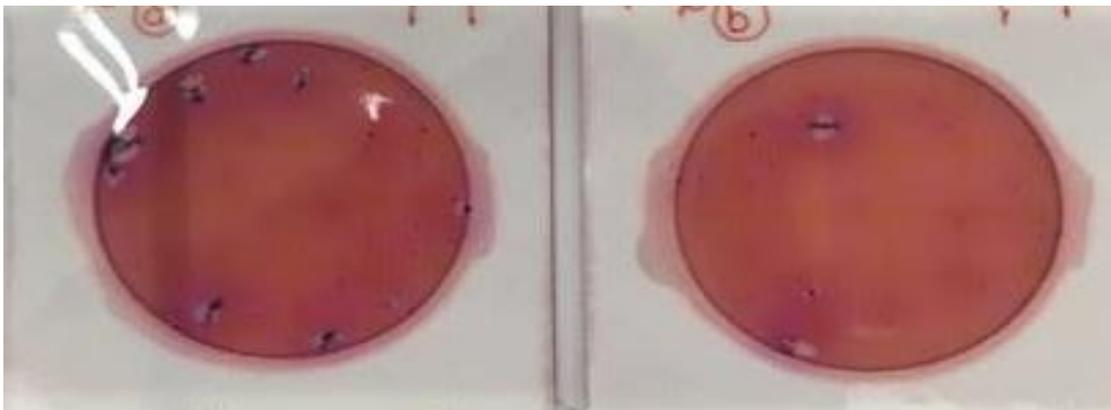
Fuente: Adriana Almendariz

ANEXO F: Placa de Recuento de Aerobios Mesófilos de las muestras Ay B



Fuente: Adriana Almendariz

ANEXO G: Placa de recuento de *E.coli*/coliformes de las muestras A y B



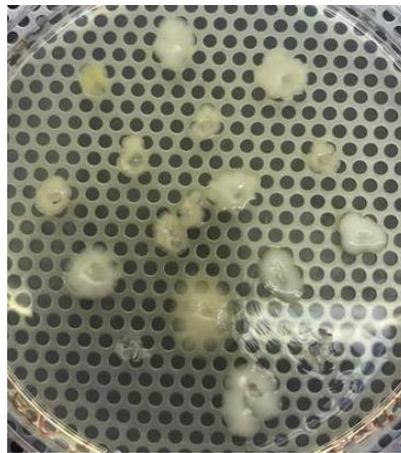
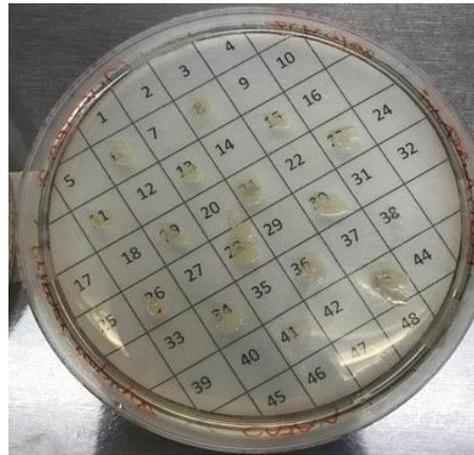
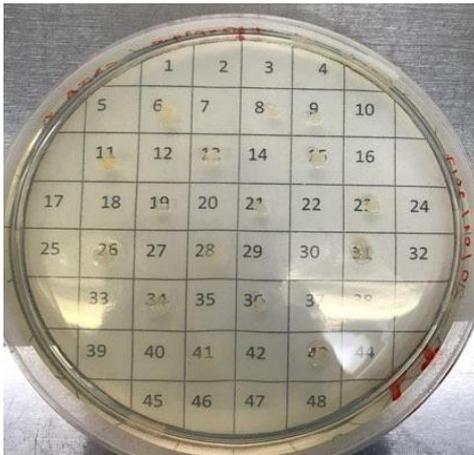
Fuente: Adriana Almendariz

ANEXO H: Placa de recuento de mohos y levaduras de las muestras A y B



Fuente: Adriana Almendariz

ANEXO I: Realización de repiques



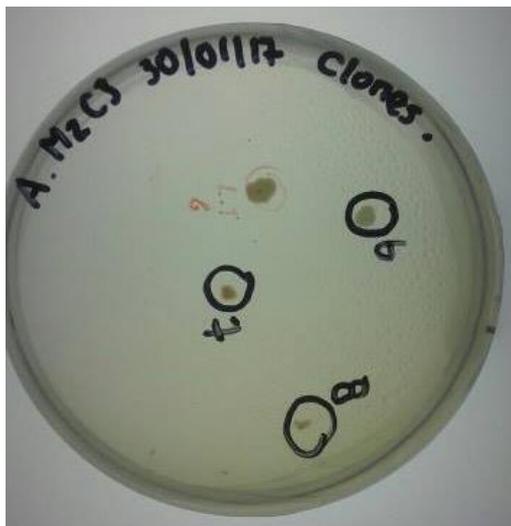
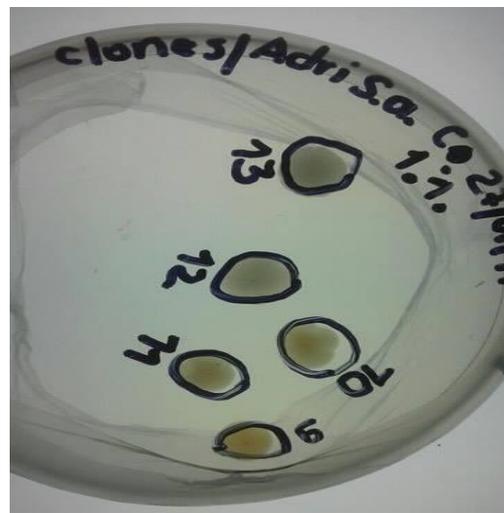
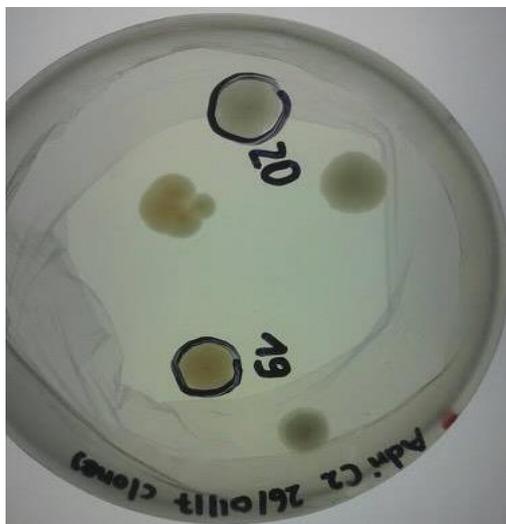
Fuente: Adriana Almendariz

ANEXO J: Siembra por agotamiento



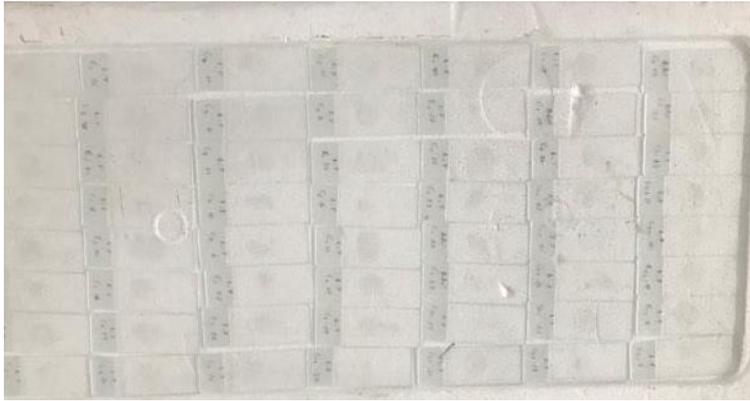
Fuente: Adriana Almendariz

ANEXO K: Clones Obtenidos



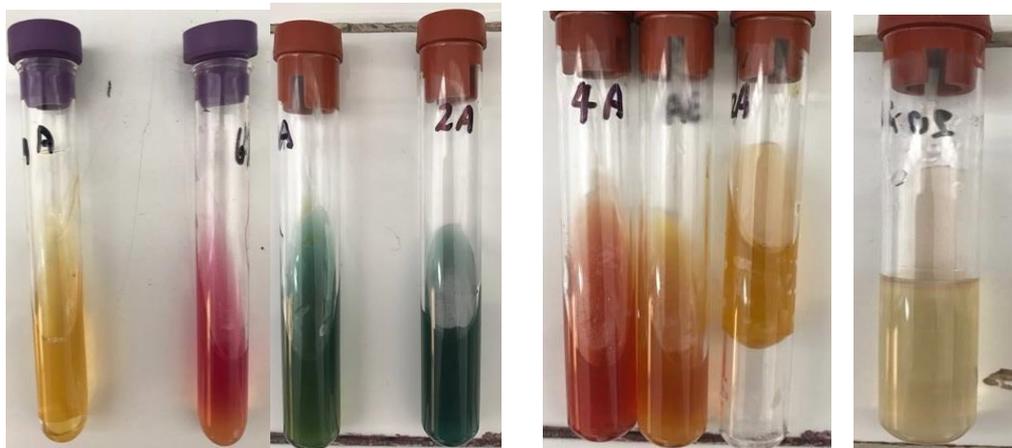
Fuente: Adriana Almendariz

ANEXO L: Tinción Gram



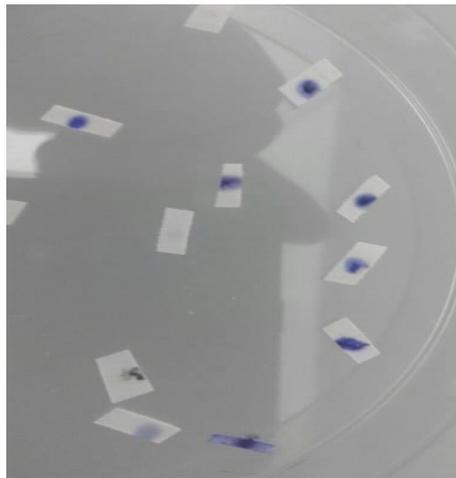
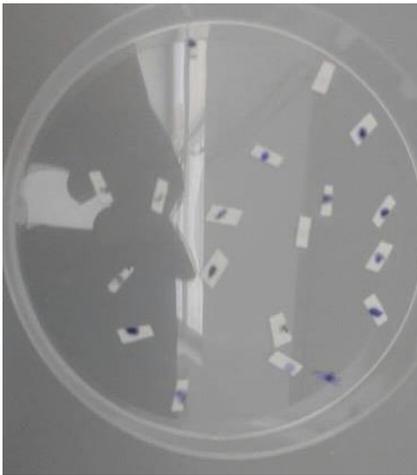
Fuente: Adriana Almendariz

ANEXO M: Pruebas bioquímicas



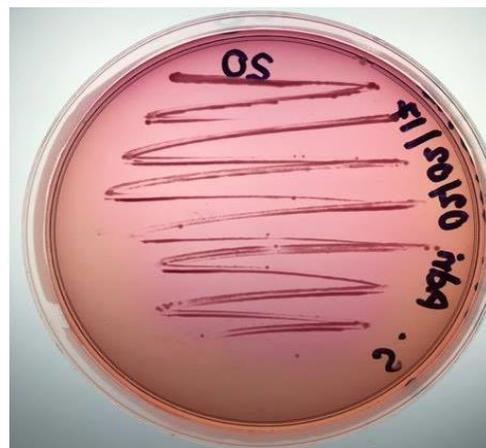
Fuente: Adriana Almendariz

ANEXO N: Prueba de la Catalasa



Fuente: Adriana Almendariz

Anexo O: Pruebas de Identificación para bacilos Gram negativos



Fuente: Adriana Almendariz

ANEXO P: Antibiograma



Fuente: Adriana Almendariz