



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD CIENCIAS

CARRERA BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA Y EVALUACIÓN
DE MULTIRRESISTENCIAS ANTIBIÓTICAS EN EL RÍO
CHIBUNGA**

Trabajo de Integración Curricular

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

AUTORA: DIANA MARISOL LANDA SAILEMA

DIRECTORA: BQCI. MISHELL CAROLINA MORENO SAMANIEGO MSc.

Riobamba – Ecuador

2023

© 2023, Diana Marisol Landa Sailema

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

Yo, Diana Marisol Landa Sailema, declaro que el presente Trabajo de Integración Curricular es de mi autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autora asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este Trabajo de Integración Curricular; el patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 16 de marzo del 2023

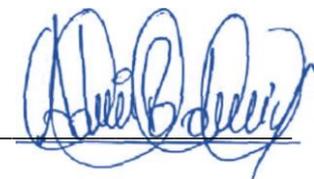


Diana Marisol Landa Sailema

180442512-0

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA BIOQUIMICA Y FARMACIA

El Tribunal del Trabajo de Integración Curricular certifica que: El Trabajo de Integración Curricular; Tipo: Proyecto de Investigación, **CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA Y EVALUACIÓN DE MULTIRRESISTENCIAS ANTIBIÓTICAS EN EL RÍO CHIBUNGA**, realizado por la señorita: **DIANA MARISOL LANDA SAILEMA**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Integración Curricular, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal autoriza su presentación.

	FIRMA	FECHA
Dra. Verónica Mercedes Cando Brito MSc PRESIDENTE DEL TRIBUNAL		2023-03-16
BQCl. Mishell Carolina Moreno Samaniego MSc DIRECTORA DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR		2023-03-16
BQF. Adriana Isabel Rodríguez Basantes MSc. ASESORA DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR		2023-03-16

DEDICATORIA

El presente trabajo se lo dedico a mi creador y padre celestial Dios por su amor incondicional, por la salud y vida, por la bendiciones que ha derramado en cada etapa de mi vida, a mis queridos padres Luis Alfonso Landa Infante, de manera especial a mi madre María Esther Sailema Sailema por ser mi fortaleza, orgullo y ejemplo de mujer luchadora, a mi hermana Silvia Maribel Landa Sailema por creer en mí y apoyarme en cada decisión, también a dos personas que ya no están a mi lado pero siempre vivirán en mi corazón a mi abuelita Petrona Sailema, y mi tío Julio Sailema por haberme cuidado y brindado su amor como si fueran mis segundos padres.

Diana

AGRADECIMIENTO

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mis padres por su lucha y apoyo incondicional. A mi tutora B.Q.Cl Mishell Carolina Moreno Samaniego MSc, por su guía y asesoría, misma que permitió la culminación de este trabajo. A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por brindarme la oportunidad de formarme como futura profesional y a los profesores de la Facultad de Ciencias y de manera especial a quienes forman parte de la carrera de Bioquímica y Farmacia por compartir sus conocimientos a lo largo de mi preparación académica.

Diana

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	xi
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	xii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xiv
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	xv
RESUMEN.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
INTRODUCCIÓN.....	1

CAPÍTULO I

1. DIAGNÓSTICO DEL PROBLEMA.....	3
1.1. Planteamiento del problema.....	3
1.2. Limitaciones y delimitaciones.....	4
1.3. Problema de la investigación.....	4
1.4. Objetivos.....	5
1.4.1. <i>Objetivo general</i>	5
1.4.2. <i>Objetivos específicos</i>	5
1.5. Justificación.....	5
1.5.1. <i>Justificación teórica</i>	5
1.5.2. <i>Justificación práctica</i>	6

CAPÍTULO II

2.1. Antecedentes de la investigación.....	7
2.2. Agua.....	8
2.2.1. <i>Fuentes hídricas de agua dulce y salada</i>	9
2.2.2. <i>Río Chibunga</i>	10
2.3. Calidad del agua.....	11
2.3.1. <i>Parámetros de calidad del agua</i>	11
2.4. Contaminación de recursos hídricos.....	11
2.5. Metodologías usadas para el tratamiento de agua.....	12
2.5.1. <i>Filtrado por membrana</i>	12
2.5.2. <i>Tratamiento fisicoquímico</i>	12
2.5.3. <i>Oxidación</i>	12

2.6. Microorganismos presentes en el agua	12
2.6.1. <i>Parásitos</i>	13
2.6.2. <i>Hongos</i>	13
2.6.3. <i>Bacterias</i>	13
2.6.3.1. <i>Morfología bacteriana</i>	13
2.7. Bacterias indicadoras de contaminación bacteriana	15
2.7.1. <i>Coliformes totales</i>	13
2.7.2. <i>Coliformes fecales</i>	13
2.8. Bacterias potencialmente patógenas para el ser humano	15
2.9. Métodos de caracterización microbiológico	16
2.9.1. <i>Medios de cultivo</i>	16
2.9.1.1. <i>Tipos de medios de cultivo</i>	16
2.9.1.2. <i>Medios de cultivo de uso común</i>	16
2.10. Tipos de Siembras	19
2.10.1. <i>Aislamiento por agotamiento por estrías</i>	19
2.10.2. <i>Siembra en tubo con medio de cultivo sólido</i>	20
2.10.3. <i>Siembra en medios líquidos</i>	20
2.11. Morfología de colonias bacterianas	21
2.11.1. <i>Tinción Gram</i>	22
2.11.1.1. <i>Bacterias gram positivas</i>	22
2.11.1.2. <i>Bacterias gram negativas</i>	22
2.12. Pruebas de identificación bioquímica	22
2.13. Antibiograma	24
2.13.1. <i>Antibióticos</i>	25
2.13.2. <i>Resistencia bacteriana a antimicrobianos</i>	25
2.14. Tipos de resistencia bacteriana	26
2.14.1. <i>Factores que generan resistencia</i>	27
2.15. Mecanismos de resistencia bacteriana	27
2.16. Prevención de la resistencia bacteriana	28

CAPÍTULO III

3. METODOLOGÍA	29
3.1. Tipo De Investigación	29
3.1.1. <i>Enfoque de la investigación</i>	29
3.2. Modalidad básica de la investigación	29
3.2.1. <i>Investigación de campo</i>	29

3.2.2.	<i>Investigación experimental</i>	29
3.3.	Criterios de inclusión y exclusión	30
3.3.1.	<i>Criterios de inclusión</i>	30
3.3.2.	<i>Criterios de exclusión</i>	30
3.4.	Ubicación de zona de muestreo	30
3.4.1.	<i>Población de estudio</i>	30
3.4.2.	<i>Obtención, manejo y conservación de muestra período mayo-julio 2022</i>	30
3.5.	Manejo y conservación	31
3.5.1.	<i>Refrigeración y Transporte</i>	31
3.6.	Caracterización Microbiológica	31
3.7.	Determinación de hongos	31
3.8.	Determinación de coliformes totales, fecales, <i>E.coli</i>	32
3.9.	Preparación de diluciones	33
3.10.	Preparación de medios de cultivo	34
3.10.1.	<i>Agar nutritivo y MacConkey</i>	34
3.10.2.	<i>Agar Hektoen</i>	34
3.10.3.	<i>Agar sangre</i>	34
3.10.4.	<i>Agar Baird Parken</i>	35
3.10.5.	<i>Medios líquidos</i>	35
3.11.	Aislamiento de bacterias	35
3.12.	Tinción Gram	35
3.13.	Preparación de pruebas bioquímicas	36
3.13.1.	<i>Prueba de catalasa</i>	37
3.13.2.	<i>Prueba de oxidasa</i>	37
3.14.	Preparación de Antibiogramas	37
3.15.	Materiales	37
3.16.	Reactivos	38
3.17.	Medios de cultivo	38
3.18.	Equipos	39

CAPÍTULO IV

4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
4.1.	Toma de muestra	40
4.2.	Parámetros microbiológicos	40
4.2.1.	Colonias puras	41
4.2.2.	Tinción gram	48

4.2.3. Pruebas Bioquímicas.....	53
4.2.4. Técnicas de fermentación en tubos múltiples	56
4.3. Antibiogramas	59
CONCLUSIONES.....	66
RECOMENDACIONES.....	68
BIBLIOGRAFÍA	
ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-2:	Estándares de la calidad de agua potable.....	11
Tabla 2-2:	Tipos de resistencia bacteriana	26
Tabla 1-4:	Datos de temperatura y pH obtenidos de muestras tomadas del Río Chibunga	40
Tabla 2-4:	Resultados de pruebas bioquímicas para bacterias cocos gram (+).....	53
Tabla 3-4:	Resultados de pruebas bioquímicas e identificación de bacilos gram (-)	54
Tabla 4-4:	Bacterias patógenas aisladas del Río Chibunga.....	55
Tabla 5-4:	NMP para Coliformes totales, Coliformes fecales y E. coli en el mes de mayo ...	56
Tabla 6-4:	NMP para Coliformes totales, Coliformes fecales y E. coli en el mes de agosto..	57
Tabla 7-4:	Resistencia y sensibilidad de bacterias de la familia Enterobacteriaceae.....	58
Tabla 8-4:	Resistencia y sensibilidad de Pseudomonas aeruginosa.....	61
Tabla 9-4:	Resistencia y sensibilidad de Aeromonas hydrophila	62
Tabla 10-4:	Resistencia y sensibilidad para Staphylococcus aureus.....	63
Tabla 11-4:	Resistencia y sensibilidad para Enterococcus faecalis	64

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1-2:	Disponibilidad y distribución del agua en el mundo.....	9
Ilustración 2-2:	Río Chibunga	10
Ilustración 3-2:	Morfología y estructura bacteriana	14
Ilustración 4-2:	Clasificación de los medios de cultivo.....	17
Ilustración 5-2:	Técnica de siembra por estrías	19
Ilustración 6-2:	Técnica de siembra en tubo con medio sólido	20
Ilustración 7-2:	Descripción morfológica de colonias bacteriana	21
Ilustración 8-2:	Procedimiento de la Tinción Gram	22
Ilustración 1-3:	Obtención, manejo y conservación de muestra mayo-julio 2022	31
Ilustración 2-3:	Aislamiento de microorganismos	32
Ilustración 3-3:	Determinación de coliformes fecales, totales y <i>E. coli</i>	33
Ilustración 4-3:	Diluciones seriadas	33
Ilustración 5-3:	Procedimiento de pruebas bioquímicas	36
Ilustración 1-4:	<i>E. coli</i> en agar sangre	41
Ilustración 2-4:	<i>E. coli</i> en agar MacConkey	41
Ilustración 3-4:	<i>E. coli</i> en agar Hektoen.....	42
Ilustración 4-4:	<i>E. faecalis</i> en agar Sangre	42
Ilustración 5-4:	<i>Y. enterocolitica</i> en agar Sangre	42
Ilustración 6-4:	<i>K. pneumoniae</i> en agar Sangre.....	43
Ilustración 7-4:	<i>K. pneumoniae</i> en agar MacConkey	43
Ilustración 8-4:	<i>S. entérica</i> en agar Hektoen	43
Ilustración 9-4:	<i>S. entérica</i> en agar SS	44
Ilustración 10-4:	<i>S. paratyphi</i> en agar SS.....	44
Ilustración 11-4:	<i>Shigella flexneri</i> en agar SS	44
Ilustración 12-4:	<i>P. mirabilis</i> en agar MacConkey	45
Ilustración 13-4:	<i>P. aeruginosa</i> en agar Sangre	45
Ilustración 14-4:	<i>Aeromonas hydrophila</i> en agar Sangre	46
Ilustración 15-4:	<i>Edwardsiella tarda</i> en agar Sangre.....	46
Ilustración 16-4:	<i>S. aureus</i> en agar Sangre.....	46
Ilustración 17-4:	<i>S. aureus</i> en agar Baird-Parker	47
Ilustración 18-4:	<i>E. coli</i> , bacilo gram negativo	48
Ilustración 19-4:	<i>S. aureus</i> cocos gram positivos.....	49
Ilustración 20-4:	<i>E. faecalis</i> cocos Gram positivos	49
Ilustración 21-4:	<i>Y. enterocolitica</i> en bacilos Gram negativo	49

Ilustración 22-4: <i>K. pneumoniae</i> bacilo Gram negativo.....	50
Ilustración 23-4: <i>S. entérica</i> bacilos Gram negativo	50
Ilustración 24-4: <i>S. paratyphi</i> bacilo Gram negativo	51
Ilustración 25-4: <i>Shigella flexnery</i> bacilo Gram negativo	51
Ilustración 26-4: <i>Proteus mirabilis</i> bacilos Gram negativo	51
Ilustración 27-4: <i>P. aeruginosa</i> bacilos Gram negativo	52
Ilustración 28-4: <i>Aeromonas hydrophilq</i> bacilo Gram negativo	52
Ilustración 29-4: <i>Edwardsiella tarda</i> bacilos Gram negativo	52

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A: TOMA DE MUESTRA

ANEXO B: MUESTRAS ROTULADAS

ANEXO C: DILUCIONES

ANEXO D: PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

ANEXO E: SIEMBRA E INCUBACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

ANEXO F: TINCIÓN GRAM OBSERVACIÓN AL MICROSCOPIO

ANEXO G: OBSERVACIÓN DE CULTIVOS PUROS

ANEXO H: RESULTADO DE PRUEBAS BIOQUÍMICAS

ANEXO I: ANTIBIOGRAMAS

ANEXO J: TÉCNICA DE NMP

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AK	Amikacina
AML	Amoxicilina
AMC	Amoxicilina + ácido clavulánico
AMP	Ampicilina
ATM	Aztreonam
AZM	Azitromicina
BLEE	Betalactamasa de espectro extendido
C	Cloranfenicol
CAZ	Ceftazidima
CF	Coliformes Fecales
CFZ	Cefazolina cefalosporina de 1ra generacion
CIP	Ciprofloxacina
CT	Coliformes Totales
CTX	Cefotaxima cefalosporina de 3da generacion
CXM	Cefuroxima cefalosporina de 2da generación
DA	Clindamicina
E	Eritromicina
GE	Gentamicina
IPM	Imipenenm
INEN	Servicio Ecuatoriano de Normalización
NMP	Número mas probable
ml	Mililitros
MSP	Ministerio de Salud Pública
OFX	Ofloxacina
OMS	Organización Mundial de la Salud
P	Penicilina
TE	Tetraciclina
TEC	Teicoplanina
TULSMA	Texto Unificado de Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente
VA	Vancomicina
W	Ácido nalidixico
µm	Micras

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue caracterizar microbiológicamente especies patógenas presentes en el Río Chibunga con el fin de evaluar la presencia de multirresistencias antibióticas, para llevar a cabo este estudio se realizó un muestreo por triplicado, en tres lugares: sector Cemento Chimborazo, Parque Ecológico y puente de la entrada a Chambo, tomando en cuenta ciertos criterios de inclusión. Las muestras fueron analizadas en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Para la identificación de bacterias se utilizó diluciones seriadas de agua de peptona, agares selectivos y nutritivos, tinción gram para confirmar la obtención de un cultivo puro, pruebas bioquímicas y, por último, para determinar la resistencia bacteriana se utilizó antibiogramas por duplicado. Se determinó así bacilos gram (-) pertenecientes a la familia *Enterobacteriácea*; *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella entérica*, *Salmonella paratyphi*, *Shigella flexnery*, *Proteus mirabilis* y *Edwardsiella tarda*. También, *Pseudomonas aeruginosa* y *Aeromonas hydrophila*; y cocos gram (+): *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*. La mayoría presentaba resistencia a tres o más antibióticos siendo los más comunes: ampicilina, ácido nalidixico y cefalozina, Por otro lado, presentaron sensibilidad a amikacina, amoxicilina + ácido clavulánico, aztreonam y cefotaxima. *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis* son las bacterias con mayor multirresistencia puesto que resisten a más de 5 grupos de antibióticos. Finalmente, se determinó por el método del NMP *Coliformes totales*, *Coliformes fecales* y *E. coli*, bacterias indicativas de la sanidad del agua, donde se concluyó que en el río Chibunga existe un exceso de los límites permisibles según la norma TULSMA presentando >1600 NMP.

Palabras clave: <BIOQUÍMICA Y FARMACIA>, <PATÓGENOS>, <PRUEBAS BIOQUÍMICAS>, <MULTIRESISTENCIAS>, <ANTIBIÓTICOS>, <CALIDAD DEL AGUA>, <BACTERIAS>.

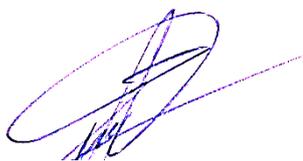
1094-DBRA-UPT-2023



ABSTRACT

The objective of this research was to microbiologically characterize pathogenic species present in the Chibunga River in order to evaluate the presence of antibiotic multiresistances. To do this study, a triplicate sampling was performed in three places: Cemento Chimborazo sector, Ecological Park and the bridge at the entrance to Chambo, taking into account certain inclusion criteria. The samples were analyzed in the Microbiology laboratory of the Science Faculty of the Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. For bacterial identification, serial dilutions of peptone water, selective and nutritive agars, gram stain to confirm that a pure culture was obtained, biochemical tests and, finally, to determine bacterial resistance, antibiograms were used in duplicate. Gram (-) bacilli belonging to the Enterobacteriaceae family; *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica*, *Salmonella paratyphi*, *Shigella flexneri*, *Proteus mirabilis* and *Edwardsiella tarda* were determined. Also, *Pseudomonas aeruginosa* and *Aeromonas hydrophila*; and cocci gram (+): *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*. Most of them showed resistance to three or more antibiotics, the most common being: ampicillin, nalidixic acid and cephalozin. On the other hand, they showed sensitivity to amikacin, amoxicillin + clavulanic acid, aztreonam and cefotaxime. *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis* are the bacteria with the highest multidrug resistance, since they are resistant to more than 5 groups of antibiotics. Finally, the MPN method was used to determine *total coliforms*, *fecal coliforms* and *E. coli*, bacteria indicative of water sanitation, where it was concluded that in the Chibunga river there is an excess of the permissible limits according to the TULSMA standard, presenting >1600 MPN.

Keywords: <BIOCHEMISTRY AND PHARMACY>, < PATHOGENS>, < BIOCHEMICAL TESTS>. <MULTIRESISTANCES>, <ANTIBIOTICS>, <WATER QUALITY>, < BACTERIA>.



Edgar Mesías Jaramillo Moyano

0603497397

INTRODUCCIÓN

El agua es un recurso natural indispensable para la vida de los seres vivos, forma parte del desarrollo sostenible y es fundamental para el progreso socioeconómico. Los ríos son una fuente importante de agua dulce en la tierra, ya que facilitan el transporte de agua y son utilizados para aumentar la producción agrícola y ganadera al convertir áreas secas en áreas húmedas. Se estima que para en los próximos quince años, el 60% de la población mundial sufrirá escasez de agua, principalmente en países del tercer mundo (ONU. 2016. p.1)

En Latinoamérica, los principales ríos tienen serios problemas de contaminación, los más afectados son las que pasan por las grandes ciudades, debido a que están expuestos a los diferentes productos contaminantes que altera su composición natural. Los ríos transportan microorganismos capaces de provocar enfermedades de transmisión hídrica. A nivel mundial, las estimaciones de enfermedades causadas por agua no tratada indican que una de cada diez personas desarrolla enfermedades gastrointestinales después de consumir alimentos contaminados con microorganismos, siendo los niños menores de 5 años la población más vulnerable (Ríos et al. 2012. p.237).

Los ecosistemas acuáticos se consideran una ruta importante de introducción de genes de resistencia bacteriana, donde los antibióticos y las bacterias causantes de enfermedades, ingresan al medio acuático a través de descargas directas de aguas residuales, plantas de tratamiento, granjas agrícolas, alcantarillas, tanques de fertilizantes, entre otros. El alarmante aumento de la resistencia bacteriana a los antibióticos es uno de los mayores problemas de salud pública. En el ambiente acuático, las bacterias pueden intercambiar genes resistentes a los medicamentos con bacterias patógenas humanas. El impacto de la resistencia a los antimicrobianos no se limita a los riesgos para la salud, sino que puede tener consecuencias económicas a nivel nacional y mundial (Puig et al. 2019. p.3).

La resistencia a los antimicrobianos se refiere a los procesos provocados por microorganismos sean bacterias, virus, hongos y parásitos que afectan y vuelven ineficaces a los fármacos utilizados en el tratamiento de las diferentes infecciones que provocan. La falta de medicamentos efectivos para tratar enfermedades infecciosas tiene graves consecuencias; según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la resistencia bacteriana provocó la muerte de 700.000 personas en 2015. Si no se interviene a tiempo este número podría aumentar a 10 millones para 2050 (OMS, 2016. pp 6-8).

En países como Estados Unidos, España, Argentina, China, Turquía y Colombia se han aislado bacterias patógenas resistentes a antibióticos clínicamente relevantes, afectando la calidad sanitaria del agua. En Ecuador, en el año 2018 se notificaron 24.000 casos de enfermedades transmitidas por agua y alimentos contaminados (Núñez et al. 2012. p. 236)

Actualmente, se realizan investigaciones innovadoras sobre nuevos medicamentos antimicrobianos, pero llevará años en llegar a los pacientes, y los nuevos tratamientos por sí solos no serán suficientes para abordar la amenaza de la resistencia a los antibióticos, la OMS trabaja con los países para mejorar la prevención y el control de infecciones y para promover el uso apropiado de los antibióticos existentes y futuros (Hiris. 2021. p.6)

Debido al incremento de la contaminación ambiental en la provincia de Chimborazo existen estudios que determinan que el río principal del cantón Riobamba presenta altos índices de contaminación bacteriana y química, siendo una problemática dentro de la población puesto que están siendo vulnerable a distintas enfermedades procedentes de bacterias patógenas. Este estudio realizó la caracterización microbiológica de muestras procedentes del río Chibunga, con el fin de evaluar la resistencia antibiótica en bacterias patógenas que habitan en este medio acuático y así crear una alerta de concientización tanto en la población como a las autoridades para crear medidas de control sanitarias con respecto al uso del agua y así obtener agua de buena calidad.

CAPÍTULO I

1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Planteamiento del problema

El agua es un recurso natural valioso para el desarrollo de la vida y la actividad humana, sin embargo, el uso indiscriminado de este elemento y la alta tasa de crecimiento de la población a nivel mundial ha ocasionado la disminución de la calidad de las fuentes de agua potable y de los ecosistemas naturales (Romeu et al., 2014, p. 2).

Además, se ha convertido en un medio de propagación de enfermedades infecciosas a causa de la contaminación de ríos y mares. En el año 2007, en Europa se determinaron 400.000 infecciones por bacterias multirresistentes que desencadenaron 25.000 muertes; mientras que, en Estados Unidos se estima que este tipo de bacterias anualmente infectan a 2 millones de personas, provocando 23.000 muertes (Alós, 2015, p. 693).

Actualmente, la comercialización a gran escala de antibióticos ha desarrollado resistencia antimicrobiana en bacterias patógenas y ambientales, lo que dificulta el tratamiento farmacológico de nuevas infecciones causadas por estos microorganismos. Dentro de las principales causas de la resistencia bacteriana se encuentra el uso inadecuado y excesivo de los antimicrobianos en el área de la salud, el alto índice de la automedicación, limitaciones en el diagnóstico oportuno de infecciones por bacterias resistentes, incumplimiento del tratamiento por parte de los pacientes y la falta de normativas que restrinjan la venta libre de antibióticos sin receta médica (Malbrán, 2017, p. 2).

La multirresistencia es provocada por las constantes mutaciones que sufren las bacterias, especialmente a nivel de las porinas, las cuales son moléculas que permiten el paso de antimicrobianos por la pared celular causando la impermeabilidad de la célula bacteriana (Roy, 2015, p. 368).

Esta situación es alarmante puesto que los antibióticos utilizados no están haciendo efecto. En 2019, la OMS identificó 32 antibióticos en desarrollo clínico según la lista de patógenos prioritarios de la OMS, de los cuales, sólo 6 se clasificaron como mejorados (OMS, 2020).

Hoy en día es común encontrar bacterias con distintos niveles de resistencia como los multidrogosresistentes (resistente a 2 antibióticos o más), extremadamente resistentes (resistentes

a 3 antibióticos o más) e incluso panresistentes, es decir bacterias que no se tratan con ningún régimen farmacoterapéutico actual. Por lo cual, se han buscado estrategias con nuevos antibióticos naturales, pero ha sido ineficaz debido a las altas tasas de mutación por el uso indiscriminado de antibióticos, siendo ineficaz en el uso clínico (Rocha et al., 2016, p. 139).

Dentro de los patógenos prioritarios para los que se necesitan nuevos antibióticos debido a su multiresistencia se encuentran microorganismos con prioridad crítica *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacteriaceae* con resistencia a carbapenémicos, dentro de la prioridad elevada se encuentran *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, *Helicobacter pylori* resistente a claritromicina y *Salmonella* resistente a fluoroquinolonas. Finalmente, con prioridad media, *Streptococcus pneumoniae* resistente a penicilina y *Shigella spp* resistente a fluoroquinolonas (OMS, 2017).

A nivel mundial, se han realizado varios planes de acción contra la resistencia a los antimicrobianos. En Ecuador en el 2019 se creó el “Plan Nacional para la prevención y control de la RAM 2019-2023”, basándose en el monitoreo y vigilancia de las resistencias bacterianas, sin embargo, el microorganismo que se ha reportado en mayor porcentaje en los servicios hospitalarios es *Escherichia coli* con más del 50%, seguido por *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*; y en menor cantidad *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis* y *Serratia marcescens*, entre otros (MSP, 2018, p. 3).

En un futuro no muy lejano la resistencia bacteriana llegaría a ser un problema sanitario muy difícil de controlar a nivel mundial, provocaría la muerte de millones de personas o a la vez dejaría secuelas graves en pacientes que se encuentran hospitalizados.

1.2. Limitaciones y delimitaciones

Para la caracterización microbiológica se tomaron muestras por triplicado, a lo largo del cauce del río Chibunga en un periodo comprendido entre mayo – julio. Se evaluó la multiresistencia antibiótica de las bacterias aisladas solo con el uso de antibiogramas de disco.

1.3. Problema de la investigación

¿Cuáles son las especies microbiológicas patógenas presente en el Río Chibunga y qué nivel de multiresistencias antibióticas poseen?

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

Caracterizar microbiológicamente especies patógenas presentes en el Río Chibunga con el fin de evaluar la presencia de multirresistencias antibióticas.

1.4.2. Objetivos específicos

- Identificar bacterias potencialmente patógenas mediante el uso de agares selectivos y pruebas bioquímicas.
- Realizar pruebas de inhibición bacteriana de las especies patógenas encontradas para determinar la existencia de multirresistencias.
- Clasificar las bacterias en los niveles de resistencia como: resistente, multirresistente o con resistencia extendida.

1.5. Justificación

1.5.1. Justificación teórica

La resistencia a los antimicrobianos es una amenaza mundial para la salud pública y requiere medidas rigurosas por parte de los gobiernos y la sociedad al ser considerada una de las principales causas de muerte en la población debido al uso irracional de antibióticos produciendo infecciones difíciles de controlar (Nuñez et al., 2016, p. 236).

En el caso de Reino Unido, se ha demostrado que, a pesar del tratamiento de las aguas residuales, se producen anualmente unos 6 millones de casos de exposición a la bacteria *Escherichia coli* resistente, y también se han documentado casos de presencia de bacterias multirresistentes presentes en animales que se destinan al consumo humano, causando a la vez la propagación en el hombre (UNEP, 2017, p. 13).

Otro problema en las áreas rurales es que las principales corrientes de desechos, como aguas residuales, desechos de los animales y la escorrentía de las tierras agrícolas, también tienen bacterias multirresistentes, convirtiéndose en un tema complejo de tratar en el medio natural, ya que, incluso en los países que realizan elevadas inversiones en el tratamiento de las aguas residuales, se ha evidenciado el aumento de las variaciones de estas bacterias (UNEP, 2017, p. 16).

En Latinoamérica en el año 2003, Brasil fue el primer país que presentó resistencia a los antimicrobianos, en el año 2005 fue Argentina y Colombia. En Ecuador en el año 2010, se identificó el primer caso de resistencia a los antibióticos, se trataba de *Klebsiella pneumoniae*, producía una enzima denominada carbapenemasa que impedía la acción de los antibióticos carbapenémicos y actualmente todos los países latinoamericanos presentan este inconveniente, pero con mecanismos diferentes de resistencia (MSP, 2018, p. 2).

Para tratar esta problemática es importante implementar acciones estratégicas para la resistencia a los antimicrobianos, fijando cinco objetivos primordialmente: promover la toma de conciencia sobre el problema, reforzar los conocimientos en cuanto a investigación y vigilancia, reducir la incidencia de las infecciones bacterianas, optimizar el uso de antibióticos y asegurar una inversión sostenible para combatir la resistencia de este grupo de patógenos (AEMPS, 2015, p. 5).

Por todo lo dicho anteriormente, esta investigación resulta de gran importancia ya que el río Chibunga es considerado uno de los cuatro ríos más contaminados del país, debido a que se descargan allí las aguas servidas, animales muertos, fertilizantes, detergentes, lubricantes y desechos orgánicos, sin embargo, es utilizada para el riego de cultivos en las comunidades de Licán, Calpi, Gatazo, Riobamba, Yaruquíes y en San Luis (Veloz & Carbonel, 2019, p. 13).

El problema es alarmante y con este estudio se pretende identificar las bacterias que presentan multiresistencia a antibióticos en el río Chibunga y a la vez que sirva de base para futuros proyectos de biorremediación y programas de concientización para el uso adecuado de esta fuente hídrica

1.5.2. Justificación práctica

Este estudio puede servir como base para futuros proyectos de investigación que utilicen métodos o procedimientos más modernos para la caracterización microbiana y la resistencia bacteriana. También se realiza con el fin de concientizar a la población sobre el uso de antibióticos y para que las autoridades desarrollen nuevas estrategias ante el uso irracional de medicamentos, puesto que se avecina una crisis sanitaria que será muy complicada de controlar misma que provocará muchas muertes.

Las bacterias aisladas del Río Chibunga y la resistencia que estas presentan a los diferentes antibióticos, es motivo de preocupación que pone en riesgo la salud de la población ya que el agua proveniente de este río es de muy mala calidad, por lo cual es importante implementar medidas sanitarias.

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

2.1. Antecedentes de la investigación

El agua es un elemento que puede convertirse en vehículo de transmisión de diversas enfermedades en la población, en la actualidad se han descrito más de 20 patologías con alto impacto en términos de morbilidad y mortalidad, donde el agua influye directa o indirectamente en el desencadenamiento de estas enfermedades en su aparición (Sánchez et al., 2015, p. 398).

Un estudio realizado en la Antártida sobre la resistencia a antibióticos en bacterias recolectadas en agua de mar determinó que, los recuentos bacterianos más altos se observaron en el agua de mar cercana a las descargas de aguas residuales, detectando la presencia de coliformes totales en un 76% de las muestras y *E. coli* en un 65% de las muestras. Del total de bacterias detectadas, el 49% mostraron resistencia al menos a un antibiótico, doce cepas fueron multirresistentes y dos cepas presentaron una resistencia intermedia a ampicilina, estreptomycin, ácido nalidíxico y cloranfenicol (Calisto et al., 2018, p. 33).

En España, un estudio sobre la calidad microbiológica del agua del río Mero, evidenció la contaminación del río con la presencia de coliformes fecales, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Chlamydomonas moewusii*, evidenciando la necesidad de mejorar el tratamiento de aguas residuales con el fin de evitar los posibles problemas producidos por las bacterias (Álvarez, 2017, p. 18).

En Panamá, una investigación sobre la calidad físico-química y microbiológica del agua del río Santa María, determinó que, el 53% de los ríos poseen aguas contaminadas o de mala calidad; en el caso del río Santa María los recuentos microbiológicos mostraron entre 347 y 1228 bacterias/100 ml en época seca y de 157 a 1237 bacterias/100 ml en épocas lluviosas. Respecto al conteo de Coliformes totales se determinaron valores de 30 a 85 bacterias/100 ml en la época seca y 31 a 164 bacterias/100 ml para la época lluviosa (Him et al., 2019, p. 14).

En una investigación en Argentina sobre las bacterias resistentes a antibióticos en aguas grises como agentes de riesgo sanitario, se identificaron bacterias heterotróficas resistentes en un 19% a cefalotina, un 8% a ampicilina; en el caso de coliformes presentaron resistencia a cefalotina, ceftazidima, ampicilina y ceftriaxona en un 90%. De los aislamientos no fermentadores de lactosa, el 10% fueron resistentes incluso a meropenem (Barahona, 2017).

Una investigación desarrollada en Quito sobre la evaluación físico-química y microbiológica de la calidad del agua de los ríos Machángara y Monjas, determinó que, la concentración de coliformes totales en el río Machángara es de 24 millones NMP/100ml y la de coliformes fecales 24000 NMP/100ml, siendo 1172,22 veces superior a los límites permisibles para la flora y fauna y 46,88 veces mayor al promedio establecido en el uso agrícola, lo cual se debe a la descarga de aguas residuales, sin tener un proceso de depuración (Campaña et al., 2017, p. 310).

En Riobamba, un estudio en el año 2017 sobre la evaluación de la calidad del agua de la microcuenca del río Chibunga-Ecuador, determinó que, las variables de contaminación en el río son; plomo, cadmio, oxígeno disuelto, coliformes fecales, aceites, grasas, tensoactivos, fosfatos, sólidos suspendidos y nitratos, además de una alteración en el pH. En la evaluación microbiológica de coliformes se observó un recuento de 200 NMP/100ml en ciertas comunidades y en la descarga del río Chibunga al río Chambo se obtuvo un recuento mayor a 30.000 NMP/100ml, calificando al agua como “pésima” (Veloz & Carbonel, 2019, p. 25).

En el año 2018, se realizó una investigación por parte de estudiantes de la UNACH con el fin de determinar bacterias patógenas y su resistencia en el regadío del del Río Chibunga, en la cual se identificaron 18 bacterias patógenas procedentes de los diferentes puntos geográficos del regadío del Río Chibunga, que fueron *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas*, *Enterococcus spp*, *Escherichia. coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Yersinia enterocolitica*, entre otras. Al medir la resistencia bacteriana los resultados para gramnegativas obtuvieron resistencia a las betalactamasas, al ácido nalidíxico y ciprofloxacino, respectivamente. En el caso de las grampositivas, *Enterococcus spp*. fenotípicamente mostró resistencia a vancomicina y teicoplanina (Molina & Orozco, 2018, p. 23).

2.2. Agua

Es un elemento vital que se distribuye a lo ancho y largo del planeta, pero en proporciones diferentes, gracias a sus propiedades ha hecho posible el desarrollo de la vida desde hace varios siglos. Su propiedad fundamental es ser disolvente universal, además tiene propiedades como calor específico, conductividad eléctrica y tensión superficial. Tiene la capacidad de participar en distintas reacciones químicas por su carácter anfótero. Por dichas características, el cuerpo humano está compuesto aproximadamente por dos tercios de agua y sin el consumo de este líquido vital, no es posible la vida después de 4 días. El agua se encuentra en constante movimiento y puede encontrarse en diferentes estados sólido, gaseoso y mayormente líquido, esto es debido al proceso conocido como ciclo hidrológico (Trevizan, 2011, p. 169).

El agua es un factor determinante en la salud de una población, puesto que al cumplir con los estándares de calidad y tratada adecuadamente antes del consumo humano reduce el riesgo de contraer enfermedades gastrointestinales.

2.2.1. Fuentes hídricas de agua dulce y salada

Se estima que en el planeta el agua disponible es de 1373 trillones de litros. Son consideradas fuentes hídricas tanto la subterráneas y superficiales.

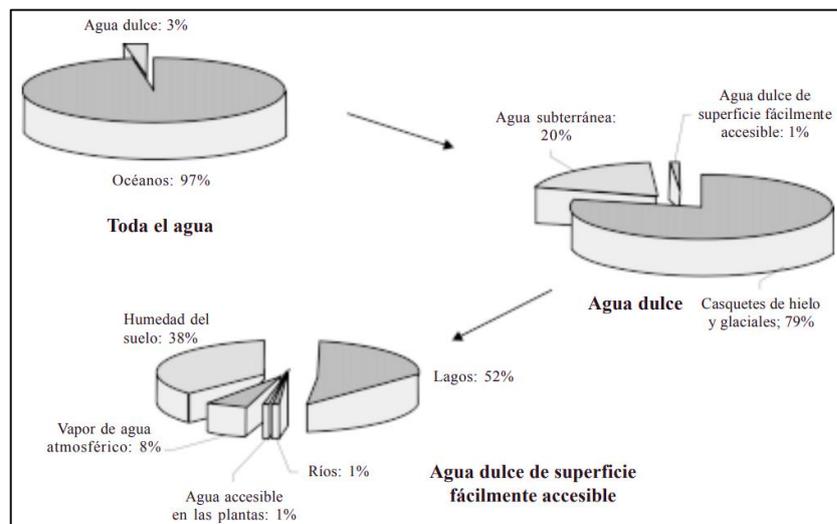


Ilustración 1-2: Disponibilidad y distribución del agua en el mundo

Fuente: Lean; Hinrichsen. 1994

En la figura 1-2, se detalla la distribución del agua en el planeta, el 97% del agua total de la Tierra constituyen las denominadas aguas saladas que hace referencia a océanos y mares; por otro lado, el 3% restante corresponde a las aguas continentales o dulces del cual el 20% corresponde al agua subterránea; el 79% a casquetes de hielo y glaciales y el porcentaje restante lo conforman ríos, lagunas, lagos, manantiales, agua lluvia, vertientes, pozos y demás (Agudelo, 2005, p. 94).

Para los seres humanos el agua dulce es un recurso indispensable para el desarrollo de la vida, por ello desde la antigüedad la población se ha visto en la necesidad de vivir principalmente junto a fuentes de este tipo de agua, mismas que se usan en actividades como la agricultura, ganadería, en el ámbito industrial, recreacional, doméstico, urbano y energético (Martos, 2015, p. 14-21).

Debido a la contaminación de este recurso hídrico la disponibilidad de agua dulce en el planeta actualmente es crítica debido a la creciente demanda para el desarrollo de diferentes actividades y también por el crecimiento de la población a nivel mundial. En base a este aspecto es importante

la conservación de los páramos Andinos, para garantizar una cantidad y calidad de agua adecuada, ya que es un ecosistema natural con una fuente hídrica invaluable para la vida en el planeta (Agudelo, 2005, p. 92).

2.2.2. Río Chibunga

El río Chibunga está situado en la zona noroeste de la provincia de Chimborazo, dispone de una superficie de 12.491 hectáreas y cubre un 54% de la superficie total de esta provincia. El río se origina en las vertientes ubicadas a las faldas del nevado Chimborazo, descendiendo desde los páramos de El Arenal y pasando por alrededor de 25 comunidades aledañas a la ciudad de Riobamba, entre ellas, San Juan, San Luis, Las Caleras, Shobol, Gatazo, entre otras; atravesando la ciudad de Riobamba de Noroeste a Sureste, para posteriormente desembocar en el río Chambo (Caicedo & Marcillo, 2019, p. 16).

Este río es uno de los recursos hídricos más importantes en la provincia, especialmente del cantón Riobamba, sin embargo, es uno de los afluentes más contaminados del país al ser un depósito de aguas servidas, descargas de agricultura, fertilizantes, lubricantes de autos, detergentes, variedad de desperdicios que arrojan las personas, etc. A pesar de esto, es ampliamente utilizado en el sector agrícola para el riego de los cultivos en las diferentes comunidades (Chela, 2020, p. 1).



Ilustración 2-2: Río Chibunga

Realizado por: Landa, Diana, 2022.

En la ilustración 2-2, se puede apreciar el río Chibunga hace cinco años, según la publicación del Diario La Prensa en el año 2021, destaca que Chibunga es uno de los cuatro ríos más contaminados del Ecuador, esto se debe principalmente a que existen conexiones de aguas servidas que desembocan directamente en este río (La Prensa, 2021).

2.3. Calidad del agua

Término utilizado para describir las propiedades químicas, físicas y biológicas del agua. Para lo cual se han creado normativas que están destinadas a garantizar la calidad sanitaria del agua y que sea adecuada para su consumo (Gutiérrez, 2016, p. 63)

2.3.1 Parámetros de calidad del agua

Los microorganismos indicadores de calidad son aquellos que se usan para controlar las condiciones de inocuidad, donde la presencia de bacterias, mohos o levaduras específicas son un indicador de deficiente higiene y de contaminación microbiológica, dentro de este grupo se encuentran los siguientes microorganismos: aerobios mesófilos, hongos, levadura, Enterobacterias, coliformes fecales y totales, mismos que presentan límites permisibles. También se toman en cuenta otros parámetros como la turbidez, pH, sabor, olor, concentración de metales pesados (Campuzano et al., 2015).

Tabla 1-2: Estándares de la calidad de agua potable

Parámetro microbiológico	Unidad	OMS
Coliformes totales	UFC/100mL	0
Coliformes fecales	UFC/100mL	0
Bacterias heterotróficas	UFC/1mL	-

Fuente: OMS, 2014

En la tabla 1-2, se detalla los estándares de calidad de agua potable de la OMS a nivel microbiológico.

2.4. Contaminación de recursos hídricos

Las fuentes hídricas se encuentran amenazadas con la contaminación continua que genera la actividad humana, vulnerabilidad del suelo y por el calentamiento global. Los contaminantes incluyen microorganismos bacterianos, virales, fúngicos y parasitarios, así como también, residuos químicos e industriales, contaminantes de minería o de la explotación del petróleo y los residuos químicos de campos agrícolas que usan antibióticos, insecticidas y fertilizantes, metales pesados y sustancias radiactivas. Las grandes masas de basura que terminan en los océanos llevan sustancias tóxicas (Gómez, 2018. p. 7).

En nuestro país, al no contar con plantas de tratamiento de aguas servidas de calidad muchas de estas sustancias están en el medio ambiente y un porcentaje de la población no tienen acceso a agua potable, lo que desencadena en problemas de salud pública, aumentando las tasas de morbimortalidad infantil por enfermedad diarreica y por consiguiente desnutrición. A su vez también afecta la flora y fauna aledaña a las fuentes hídricas (Gómez, 2018. p. 8).

2.5. Metodologías usadas para el tratamiento de agua

El objetivo de las plantas de tratamiento de agua es la depuración de las aguas residuales provenientes de una población o sector industrial, eliminar las sustancias contaminantes que estén presentes y finalmente devolverla al ciclo del agua para una posterior reutilización (Lander, 2020, p. 21).

2.5.1. Filtrado por membrana

Método que consiste en que el agua pase por filtros de diferentes tamaños, eliminando componentes indeseables. Se encuentra la hiperfiltración u osmosis inversa que retiene las sales disueltas, la nanofiltración es usada en procesos industriales y separa las sustancias orgánicas como los colorantes, la ultrafiltración es posible eliminar bacterias y virus eficazmente (Bes y Bengoa, 2018, pp.7-10).

2.5.2. Tratamiento fisicoquímico

La floculación y coagulación son los tratamientos más usados, pueden ser aplicados a diversos afluentes para obtener mejores resultados, presenta una sensibilidad menor a las variaciones, la desventaja que presentan es que no son capaces de eliminar productos de aseo personal y farmacéuticos (Marín, 2003, pp.3-5).

2.5.3. Oxidación

Consiste en la aplicación de cloro u ozono como un oxidante para la potabilización y la eliminación de sustancias orgánicas en el tratamiento de aguas residuales, mediante la degradación en fase líquida a temperatura y presión elevada (Sánchez y García, 2018, p. 103).

2.6. Microorganismos presentes en el agua

En los ecosistemas acuáticos se puede encontrar una gran variedad de microorganismos como: hongos, bacterias, parásitos, algas, que pueden vivir prácticamente en cualquier nicho ecológico

y adaptarse a condiciones ambientales inestables debido a su diversidad genética y metabólica, rápido crecimiento y capacidad de intercambio de genes. Se han identificado microorganismos locales que se desarrollan de forma óptima en este medio hídrico y otros microorganismos del suelo y del aire, cuya variabilidad dependerá de la temperatura, turbidez y materia orgánica del medio acuático (Marín, 2014, p. 4).

2.6.1. Parásitos

Microorganismos que dependen de manera temporal o permanente de su hospedero para sobrevivir obteniendo nutrición y morada, ocasionando daño funcional o estructural. Se dividen en: protozoarios, nematodos y platelmintos. Los protozoarios son eucariotas unicelulares microscópicos con un núcleo y orgánulos rodeados por membrana. Por otro lado, los helmintos, que comprenden platelmintos y nematelmintos, son gusanos macroscópicos multicelulares que poseen tejidos diferenciados y sistemas complejos; con una longitud variada de más de 1 m a menos de 1 mm. La mayoría de los protozoarios y helmintos son de vida libre (Ryan & Ray, 2017).

2.6.2. Hongos

Son eucariotas unicelulares o pluricelulares con un nivel de complejidad biológica mayor que las bacterias. Su reproducción es mediante esporas misma que puede ser sexual o asexual, están conformados por estructuras filamentosas denominadas hifas y el conjunto de ellas forman el micelio. Obtienen nutrientes mediante absorción, la mayoría son formas de vida libre que juegan un papel de descomposición en el ciclo energético. De las más de 90 000 especies conocidas, unas 200 causan enfermedades en humanos (Granada & Corres, p. 3).

2.6.3. Bacterias

Organismos microscópicos unicelulares capaces de reproducirse por fisión binaria, duplicando simultáneamente su ADN para que cada célula hija tenga el mismo genoma. Tienen tres formas básicas: coco, bacilo y espiral cada uno tendría características diferentes. La estructura de estas células es similar a la de los eucariotas, ya que tiene una membrana celular y ribosomas que contienen información genética (Vargas, 2014, p. 2595).

2.6.3.1. Morfología bacteriana

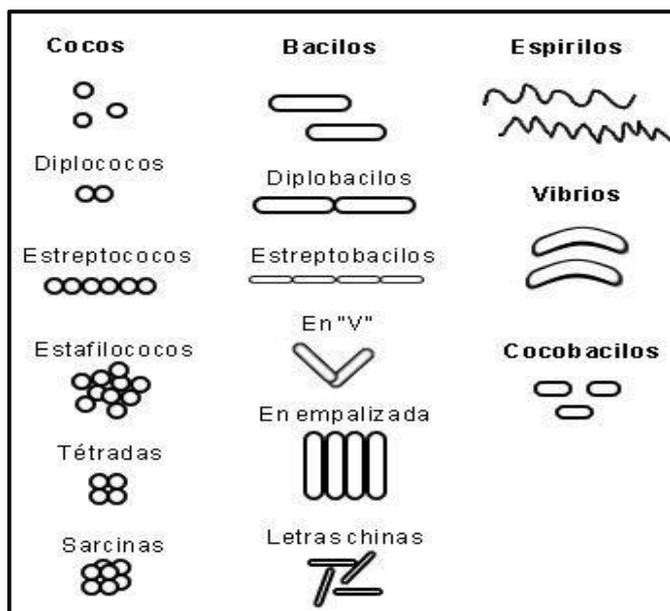


Ilustración 3-2: Morfología y estructura bacteriana

Fuente: Aliaga. 2011, p. 4

Las características morfológicas están determinadas principalmente por la pared celular. Las bacterias pueden ser observadas a simple vista cuando forman colonias sobre el medio de cultivo su morfología dependerá del borde y cómo se eleva sobre el medio. A nivel microscópico las bacterias tienen tres formas básicas: las bacterias esféricas llamadas cocos, bacterias alargadas denominadas bacilos, bacterias curvas y aquellas con forma de espiral llamadas espiroquetas, espirilos, vibriones; cada una presentarán distintas características, suelen tener un tamaño entre 0,1 y 4 micras, también se distinguen entre bacterias gran negativas y gran positivas (Vargas, 2014, p. 2597).

2.7. Bacterias indicadoras de contaminación del agua

Desde el punto de vista sanitario el estado bacteriológico del agua es indispensable para el consumo. Las normas de calidad bacteriológica estipulan que el agua no debe contener patógenos de origen entérico y parásitos intestinales que transmitan enfermedades como salmonelosis, shigelosis, amebiasis y otras (Apella & Araujo, 2005, p. 48)

Los microorganismos indicadores de calidad son aquellos que se usan para controlar las condiciones de inocuidad, donde la presencia de bacterias, mohos o levaduras específicas son un indicador de deficiente higiene y de contaminación microbiológica, dentro de este grupo se encuentran los siguientes microorganismos (Campuzano et al., 2015, pp. 5):

- Aerobios mesófilos
- Hongos y levaduras

- Enterobacterias
- Coliformes totales
- *Pseudomona maltophilia*

2.7.1. Coliformes totales

Las Enterobacterias lactosa-positivas son un grupo de bacterias caracterizadas por la fermentación de lactosa y la producción de ácido y gas dentro de las 48 horas, la temperatura varía entre 30 y 37°C. Constituyen el 10% de los microorganismos intestinales de humanos y animales, se consideran degradadores en cuerpos de agua, estas bacterias actúan como alarmas de contaminación, no se puede identificar la fuente, pero indican un tratamiento de desinfección fallido (Aza M, 2019, pp. 13-15).

2.7.2. Coliformes fecales

Representan un significado sanitario relevante y, por lo tanto, desempeñan un papel crucial en el análisis de alimentos y agua. *E. coli* es considerado el más importante de los coliformes fecales o termotolerantes que indican la calidad del agua tratada y la posible contaminación fecal. *Escherichia coli* es una bacteria gramnegativa que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, tiene forma de bastón, se considera un buen indicador de contaminación fecal. Tiene una estructura antigénica. La mayoría de las bacterias que pertenecen al grupo *E. coli* son parte de la flora intestinal normal de los humanos y los animales de sangre caliente, y la mayoría de las cepas son inofensivas, pero algunas son patógenas (Aza M, 2019, pp. 14-17).

2.8. Bacterias potencialmente patógenas para el ser humano

La patogenicidad es una cualidad que tienen las bacterias para causar una enfermedad infecciosa en un huésped, pueden ser clasificadas de acuerdo con su grado de virulencia. Las bacterias con mayor virulencia para el hombre pueden producir enfermedades infecciosas en cualquier huésped, incluso los patógenos primarios o verdaderos, como la *Salmonella*. En cambio, las especies que atacan a individuos inmunodeficientes son patógenos oportunistas, como por ejemplo *Pseudomonas aeruginosa*. Dentro de las bacterias patógenas destacan: *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Proteus mirabilis*, *Streptococcus gamahemolítico*, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica* (Umaran et al., 2017, p. 2).

La infección se da por vía oral-fecal a través de la ingestión de agua o alimentos contaminados, causa infecciones agudas y crónicas. Los síntomas más comunes que presentan son vómito, fiebre, dolor abdominal y diarrea severa, dependiendo el tipo de bacteria los síntomas pueden aparecer después de unas horas o días de la ingestión de los microorganismos (Pasachova et al., 2019, pp. 25-30).

2.9. Métodos de caracterización microbiológico

Los métodos microbiológicos se basan principalmente en la detección y cuantificación de microorganismos en función a su capacidad para crecer en un medio de cultivo establecido, seguida de la confirmación de los aislamientos mediante pruebas bioquímicas o inmunológicas. El aislamiento en cultivo permite estudiar los microorganismos, identificarlos y determinar su sensibilidad a los antimicrobianos. La identificación de las bacterias implica la confirmación del aislamiento mediante examen macroscópico y microscópico, lo que permite una mayor velocidad y confiabilidad (Camaro et al., 2014, p. 7).

2.9.1. Medios de cultivo

Conjunto de elementos o sustancias que pueden ser orgánicos o inorgánicos, naturales o artificiales. Su finalidad es asegurar el crecimiento de microorganismos u otras células aportando los nutrientes necesarios para su conservación y/o desarrollo. El medio elegido dependerá del microorganismo a identificar y de la necesidad de un aislamiento adecuado. Los microorganismos crecen en un rango de pH neutro de 6,8 a 7,6; la temperatura óptima para su crecimiento es de 35-37°C (Rodríguez & Zhurbenko, 2018, p. 12).

2.9.1.1. Tipos de medios de cultivo

Para que los microorganismos crezcan en el laboratorio, se les debe proporcionar una cantidad suficiente de nutrientes y un medio adecuado a las condiciones fisicoquímicas para su desarrollo. Se suelen utilizar placas de Petri con agar y nutrientes específicos dependiendo del microorganismo a aislar (Barrero, 2016, p. 39)

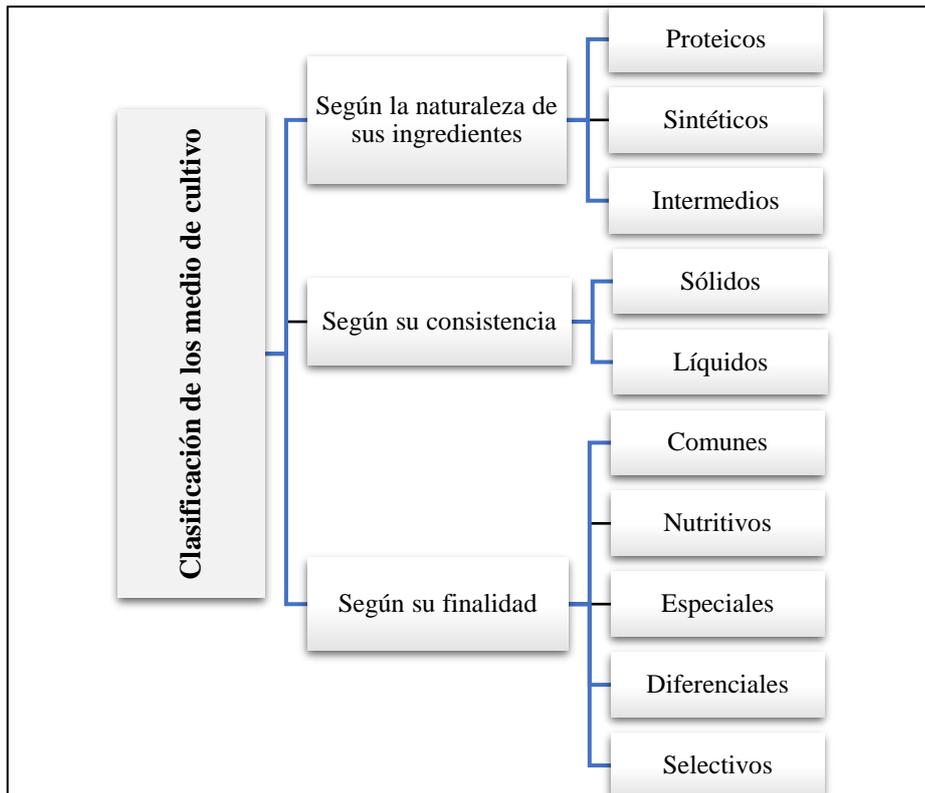


Ilustración 4-2: Clasificación de los medios de cultivo

Fuente: Rodríguez & Zhurbenko, 2018, pp. 15-16

Realizado por: Landa, Diana, 2022.

No existe una clasificación definitiva para los medios de cultivo, en la figura 4-2 se muestra la clasificación más común utilizada en los diferentes laboratorios. Según la consistencia, los sólidos se realizan en placa para aislar o en tubos haciendo referencia a los diferentes agares, los líquidos se llevan a cabo en tubos y son los caldos utilizados como medio de enriquecimiento. Según la finalidad, los selectivos permite el crecimiento y desarrollo de un microorganismo específico e inhibe el crecimiento de bacterias distintas a las que se desea aislar (Burguet et al., 2013, p. 35).

Un medio nutritivo es un medio de cultivo que consta de sustancias adicionales como suero, sangre, azúcares, tejidos y extractos de plantas que promoverán el crecimiento de microorganismos que son una minoría en una población bacteriana. Medios de diferenciación: permiten la diferenciación visual de dos o más tipos de colonias puesto que las sustancias químicas se combinan con los metabolitos bacterianos causando coloración (Barrero, 2016, p. 41).

2.9.1.2. Medios de Cultivo de uso común

- *Agar nutritivo:* medio sólido simple no selectivo y ni diferencial. En este medio pueden crecer diversas bacterias sin limitaciones, que no sean exigentes desde el punto de vista

nutricional. Se utiliza principalmente para el subcultivo de especies, mantenimiento de cepas, recuento de colonias por ser el medio transparente, base para la preparación de agar sangre, etc. (Gil, 2009, pp.2-3).

- *Agar sangre*: está destinado para el aislamiento de microorganismos gram positivos y gram negativos exigentes. Este agar se obtiene combinando un agar base, que puede ser agar Columbia, TSA y sangre de carnero o humana al 5% (Vaz de Mello, 2013, p 2).
- *Agar MacConkey*: medio selectivo y diferencial para el aislamiento de bacilos gram negativos no exigentes, especialmente Enterobacteriaceae, incluidas bacterias oportunistas y enteropatógenas. Se utiliza para distinguir las bacterias gramnegativas fermentadoras de lactosa (las colonias adquieren un color rosa) de las bacterias no fermentadoras (colonias incoloras). La digestión pancreática de gelatina y alimentos proteicos (carne y caseína) proporciona nutrientes esenciales, vitaminas y factores nitrogenados necesarios para el crecimiento microbiano (Aryal, 2022, p. 2).
- *Agar Salmonella- Shigella (agar SS)*: medio selectivo y diferencial para el aislamiento de bacterias entéricas patógenas, en particular las que pertenecen al género *Salmonella* y *Shigella*. Contiene sales biliares, verde brillante y citrato. Los organismos que fermentan la lactosa producen un ácido que, en presencia de un indicador rojo neutro, favorece la formación de colonias rojas. Los organismos que no fermentan la lactosa forman colonias transparentes (Becton, 2013 p. 1).
- *Medio Baird - Parker*: medio selectivo usado para el aislamiento y diferenciación de *Staphylococcus aureus*, estas colonias tienen la característica de ser negras y redondas. Inhibe el crecimiento de otras especies del género *Staphylococcus*. (Gil, 2019, p. 3).
- *Mueller Hinton*: medio de cultivo nutritivo usado principalmente en la ejecución de antibiogramas por la técnica de difusión, se usa para probar la sensibilidad hacia antibióticos o sulfonamidas de patógenos clínicamente importantes (Cona, 2002, p. 79).
- *Agar Sabouraud*: El pH ácido favorece el crecimiento de hongos y levaduras, especialmente dermatofitos, se recomienda la adición aséptica de cicloheximida, penicilina y estreptomina antes de su uso para suprimir la flora contaminante. La adición de antibióticos de amplio espectro inhibe un gran número de bacterias grampositivas y gramnegativas (Martínez et al., 1997, p. 188).

2.10. Tipos de siembra en el medio de cultivo

La siembra o inoculación es la introducción artificial de una muestra o colonia bacteriana en un medio nutritivo para iniciar un cultivo microbiano y promover su desarrollo y reproducción, se debe realizar en un medio estéril y aséptico.

Después de la inoculación, el medio se incuba a una temperatura adecuada para el crecimiento (Quenta, 2020, p.2)

- Siembra por inmersión
- Siembra en doble capa
- Siembra en superficie
- Siembra en estría
- Siembra masiva

2.10.1. Aislamiento por agotamiento por estría

Método simple y rápido de agotamiento gradual y continuo del inóculo en un medio sólido con ayuda de un asa bacteriológica esterilizada, generalmente contenido en placas de Petri. El objetivo es conseguir un número reducido de bacterias distribuidas individualmente en la superficie de la placa, permite identificar visualmente la diferencia morfológica de las colonias presentes. Cuando se incuban, cada una de las bacterias formará una colonia. Cada colonia individual dará lugar a una colonia pura (Sanz, 2011, p.20)

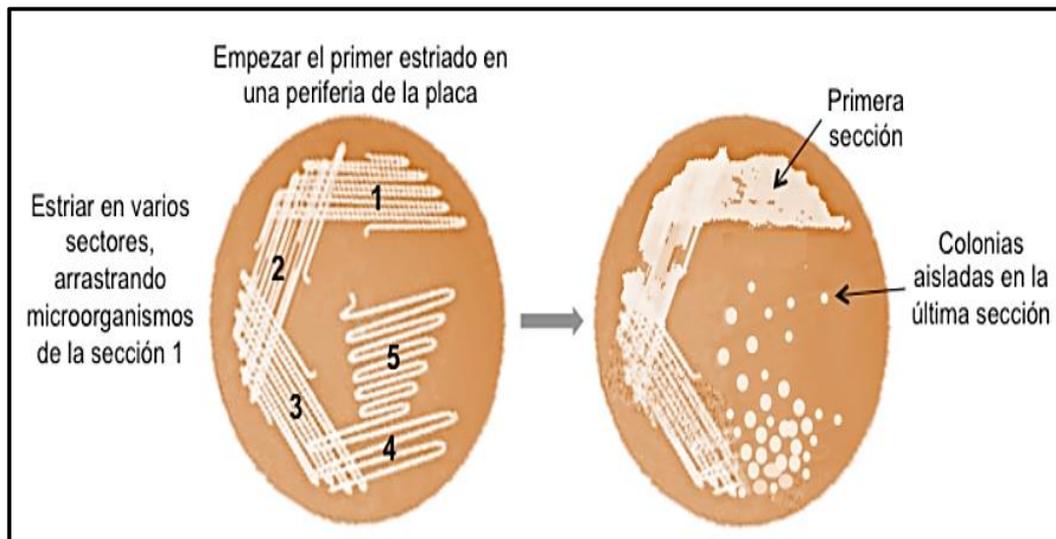


Ilustración 5-2: Técnica de siembra por estrías

Fuente: Bonilla & Pajares, 2016, p. 34

2.10.2. Siembra en tubos con medio de cultivo sólido

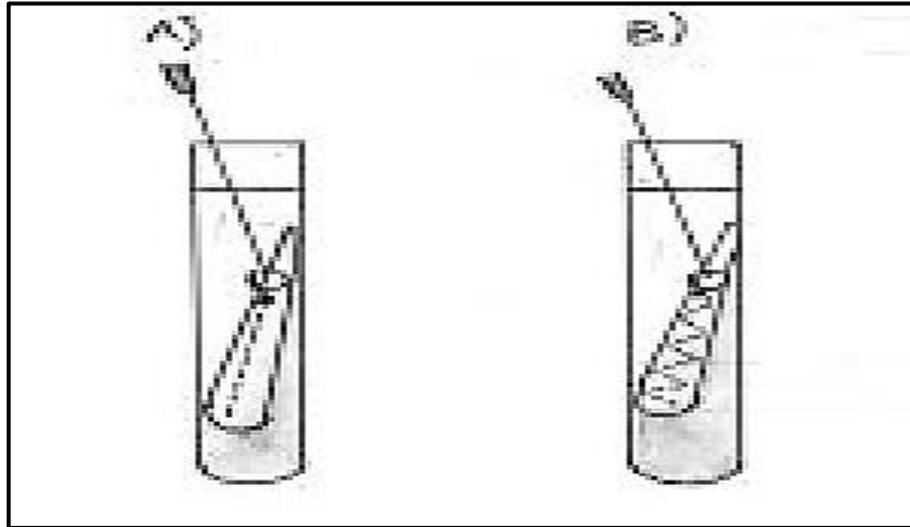


Ilustración 6-2: Técnica de siembra en tubo con medio sólido

Fuente: Osorio, 2014, p. 4

La siembra en tubos que contienen medios sólidos a menudo se utiliza para mantener cultivos puros o para inocular pruebas bioquímicas.

A.) Por picadura o punción el medio de cultivo se encuentra solidificado de forma recta o inclinada. Con ayuda de una aguja esterilizada se introduce la colonia a sembrar en el medio cortando longitudinalmente hasta el fondo. Este método es utilizado para estudiar la movilidad de las bacterias (Osorio, 2014, p. 4).

B.) Siembra por estrías en superficie para esta siembra el medio de cultivo solidificado esta inclinado, se toma la muestra de colonias a sembrar con un asa estéril se extiende por la superficie del medio en zig zag, haciendo estrías no muy amplias ni estrechas, iniciando en la parte más profunda de la parte inclinada y termina cerca de la boquilla del tubo (Santambrosio, 2019, p. 4)

2.10.3. Siembra en medios líquidos

La inoculación en medio líquido implica la transferencia de las colonias que se desee conservar, enriquecer o favorecer el crecimiento cuando la muestra obtenida es muy escasa. El crecimiento puede aparecer como turbidez, formación de película o sedimento (Luna, 2012, p. 32).

2.11. Morfología de las colonias bacterianas

Forma	Borde	Elevación	Superficie
Puntiforme	Entero	Plana	Lisa o rugosa
Circular	Ondulado	Elevada	Mate o brillante
Rizoide	Lobulado	Convexa	Seca o cremosa
Irregular	Filamentoso	Crateriforme	Invasiva o superficial
Filamentosa		Acuminada	

Ilustración 7-2: Descripción morfológica de colonias bacteriana

Fuente: Pomposo et al., 2013, p. 14

En las cajas Petri se puede observar y clasificar a las colonias bacterianas mediante características como el tamaño, forma, textura, borde y en algunos casos por el color característicos, y aunque pueden variar según el medio en el que se encuentren, en condiciones controladas son constantes y dependen de las bacterias que las componen. A su vez se puede realizar una observación microscópica mediante una tinción Gram (Moreno, 2004, p. 10).

2.11.1. Tinción Gram

Es una herramienta esencial para diferenciar distintos tipos de bacterias por color, morfología y asociación. En 1884, el Dr. Christian Gram desarrolló este método para clasificar las bacterias en grampositivas y gramnegativas en función de su composición estructural. Esta tinción se basa en colocar como primer colorante cristal violeta misma que tiene afinidad por el peptidoglicano de la pared bacteriana. Luego se inserta Lugol, que actúa como mordiente evitando la salida de cristal violeta al formar un complejo de cristal violeta-yodo.

Posteriormente, se aplica una mezcla de alcohol y acetona, que deshidrata la pared bacteriana. Finalmente, se coloca fucsina como tinción secundaria o contra tinción para teñir las bacterias que no pueden retener el complejo de yodo violeta cristalino (Corrales & Caycedo, 2019, pp. 84-85).

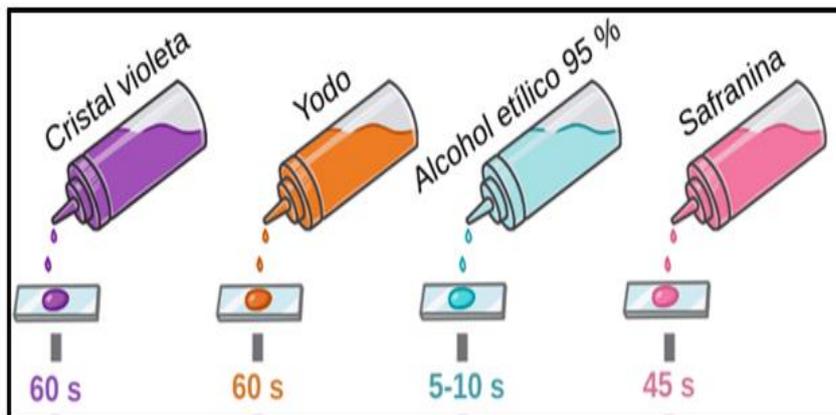


Ilustración 8-2: Procedimiento de la Tinción Gram

Fuente: Pomposo et al., 2013, p. 14

En la figura 8-2, se muestra el procedimiento de la tinción gram, los reactivos que se utiliza como son: cristal violeta, yodo, alcohol etílico al 95% y safranina con sus respectivos tiempos.

2.11.1.1. Bacterias gram positivas

Después de la tinción de Gram, tienen un aspecto púrpura característico cuando se observan con un microscopio óptico. Esto se debe a la conservación de la tinción de cristal violeta en la gruesa capa de peptidoglicano de la pared celular. Los ejemplos de bacterias grampositivas incluyen *estafilococos*, todos los *estreptococos* y algunas *listerias* (Steward, 2019, p. 7).

2.11.1.2. Bacterias gram negativas

Tienen un color rojizo pálido cuando se observan con un microscopio óptico después de la tinción de Gram. Esto se debe a que la estructura de su pared celular no puede retener la tinción de cristal violeta, por lo que se colorea solo con la contra tinción de safranina. Ejemplos de Gram negativos las bacterias incluyen *enterococos*, especies de *Salmonela* y especies de *Pseudomonas* (Steward, 2019, p. 9).

2.12. Pruebas de identificación bioquímica

Las pruebas bioquímicas pueden determinar las características metabólicas de las bacterias a identificar. Algunas de estas pruebas son métodos rápidos que requiere de segundos para su lectura ya que evalúan la presencia de enzimas, otras requieren un periodo de incubación que varía de seis a dieciocho horas (Fernández et al., 2010, p. 6).

- **Catalasa:** Las bacterias sintetizadoras de catalasa hidrolizan el peróxido de hidrógeno en agua y el oxígeno se libera en forma de burbujas de gas. Catalasa positiva *Streptococcus*, catalasa negativa y *Enterococcus* (Fernández et al., 2010, p. 6).
- **Oxidasa:** Los microorganismos que tienen citocromooxidasa en su cadena respiratoria se consideran oxidasa positivos, por la presencia de enzimas oxidasas se produce H₂O₂. Todos los microorganismos oxidasa positivos son aerobios o anaerobios facultativos (Ramírez et al., 2018, p. 67).
- **Coagulasa:** La coagulasa es una enzima extracelular producida principalmente por *Staphylococcus aureus*. Esta enzima reacciona convirtiendo el fibrinógeno en fibrina para coagular el plasma. Se utiliza para distinguir *Staphylococcus aureus* (coagulasa positiva) de *Staphylococcus epidermidis* (coagulasa negativa) (Ramírez et al., 2018, p. 67).
- **Lactosa:** Esta prueba distingue Enterobacterias de coliformes fecales, cambiando el pH del medio. Las colonias positivas para lactosa aparecen de color púrpura o roja (Luna, 2012, p. 42).
- **TSI:** Esta prueba es utilizada para visualizar la fermentación de carbohidratos (glucosa y lactosa) en el grupo Enterobacteriaceae, también para la producción de gas y ácido sulfhídrico. Para lo cual el medio de cultivo debe estar solidificado en forma de pico de flauta (inclinado). En la producción de SH₂ se forma un precipitado de color negro de sulfuro. Al fermentar glucosa hay la presencia de burbujas y se da un viraje en el fondo del tubo, al fermentar lactosa se da un viraje en la superficie del tubo, si existe fermentación vira el color a amarillo (Gomez. 2001. pp. 73-74)
- **SIM**

Indol: se basa en la reacción del indol con el grupo aldehído del p-dimetilaminobenzaldehído para formar un complejo rojo (reactivos de Kovac) (Ramírez et al., 2018, p. 61).

Movilidad: algunas bacterias se mueven por medio de flagelos y la motilidad es una característica importante que finalmente identifica a una especie. La motilidad se explica por la observación macroscópica del medio de cultivo por la presencia de zonas de crecimiento difusas que se extienden desde la línea de inoculación (Ramírez et al., 2018, p. 62).

Producción de ácido sulfhídrico: se detecta por su apariencia negra, puesto que el sulfuro de hierro se produce por la capacidad de ciertas bacterias para liberar azufre de los aminoácidos (Ramírez et al., 2018, p. 62).

- **Prueba de citrato:** Esta prueba determina si el microorganismo utiliza citrato como única fuente de compuestos de carbono, nitrógeno y amoníaco en su metabolismo, resultando en un medio alcalino (Fernández, 2010, p. 8).
- **Prueba de ureasa:** En ciertos microorganismos, la hidrólisis de la urea es catalizada por una enzima especial, la ureasa, para producir dos moléculas de amonio, agua y dióxido de carbono, lo que resulta en la formación de un color rosado (Ramírez et al., 2018, p. 63).
- **Prueba LIA:** Esta prueba se utiliza para distinguir bacilos gramnegativos de la familia *Enterobacteriaceae*, especialmente bacterias fermentadoras de lactosa y productoras de H₂S del género *Salmonella* (Lopardo, 2016, p. 343).
- **Fermentación de manitol:** Esta prueba utiliza un medio selectivo especialmente formulado para distinguir los microorganismos *Staphylococcus* del medio de fermentación, que tiñe el medio de amarillo debido a la presencia de metabolitos ácidos (Reynoso et al., 2015, p. 37).

2.13. Antibiograma

El estudio de la sensibilidad a los antibióticos en una muestra biológica tiene dos objetivos principales: el primer paso es guiar al clínico sobre la elección del mejor tratamiento individualizado para el paciente y el segundo paso es la monitorización de la evolución de la resistencia bacteriana, revisando el espectro antibiótico y actualizando los tratamientos empíricos. Los antibiogramas miden la sensibilidad que tiene una bacteria a los distintos antimicrobianos de forma in vitro y a partir de los resultados obtenidos se predice la eficacia in vivo.

Consiste en inocular una bacteria en una determinada concentración de antibiótico, categorizando a los microorganismos en categorías clínicas como: bacteria sensible, intermedia o resistente, también se puede hacer un análisis cuantitativos al determinar la concentración mínima del antibiótico que inhibe al crecimiento de la bacteria en mg/l o µg/ml en medios líquidos o sólidos donde se disuelven las diferentes concentraciones del antimicrobiano (Cercenado, 2018, p. 215).

- **Sensible:** El microorganismo presenta una gran área de inhibición por el fármaco con el 95% de éxito. El fármaco inhibe al microorganismo patógeno; puede ser una elección apropiada para el tratamiento (Cercenado y Cantón, 2010, p.45).
- **Resistente:** Presenta muy poco o casi nada de halo de inhibición. El fármaco no posee efecto inhibitorio sobre el microorganismo; por lo que no es un fármaco de elección para el tratamiento.

No es de esperar ningún efecto terapéutico sea cual fuere el tipo de tratamiento. (Cercenado y Cantón, 2010: p.45)

2.13.1. Antibióticos

Los antibióticos son un grupo de medicamentos que tienen la capacidad de suprimir el desarrollo de los microorganismos y eventualmente provocar su eliminación del huésped. El uso de antibióticos se ha extendido a agentes antibacterianos de tipo sintético como las sulfonamidas y las quinolonas. Se han identificado dos categorías de antimicrobianos (Camacho y Volfredo, 2010, p. 32):

- **Bactericidas:** se encuentran los β -lactámicos como: penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapénicos, también los aminoglucósidos, quinolonas y glicopéptidos
- **Bacteriostáticos:** en este grupo están los macrólidos, sulfamidas, tetraciclinas, clindamicina y cloranfenicol.

2.13.2. Resistencia bacteriana a antimicrobianos

La resistencia bacteriana es un mecanismo natural de supervivencia bacteriana que surge ante la presencia de una presión negativa como: un antibiótico, anticuerpos, células macrófagas, etc. La alta prevalencia de las enfermedades infecciosas, el alto costo de medicación, la pobreza, la tarifa de la atención sanitaria, la venta libre de medicamentos y la falta de control, han contribuido al uso inadecuado de antibióticos y por ende, al incremento de las resistencias antimicrobianas (Quizhpe, 2014, p. 7).

Dentro de los efectos que causa la resistencia bacteriana se encuentra la muerte del paciente cuando no hay respuesta a los tratamientos habituales, prolongando así la duración de la enfermedad, una mayor propagación de los microorganismos resistentes hacia otras personas, además, varias enfermedades podrían volverse incurables, como es el caso de la gonorrea, amigdalitis, neumonía e infecciones de las vías urinarias. También se incrementa el costo de la asistencia médica, debido a que las infecciones dejan de responder a los antibióticos de primera línea, o que ocasiona riesgo sobre los logros de la asistencia sanitaria, haciendo peligrar a los adelantos alcanzados hasta la actualidad, perjudicando la economía del país por los costos sanitarios (Quizhpe, 2014, p. 8).

Por otro lado, la resistencia bacteriana se presenta cuando el antibiótico utilizado ya no posee eficacia para terminar con la bacteria por lo que las infecciones persisten en los pacientes. El

fenómeno descrito, puede aparecer cuando las bacterias se tratan con cierto antibiótico y un pequeño grupo de estos microorganismos logra sobrevivir, crecer y propagarse, causando infecciones difíciles de tratar. Los microorganismos multirresistentes (MMR) son microorganismos que presentan resistencia a más de una familia o grupo de antimicrobianos de uso habitual, suponen dificultad para los tratamientos y pueden poseer la posibilidad de generar brotes epidémicos.

Las bacterias hospitalarias que presentan multirresistencia como es el caso de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM), *Enterococcus spp.* que presenta resistencia a vancomicina (ERV), enterobacterias capaces de producir betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y aquellos bacilos gramnegativos como *Acinetobacter baumannii* o *Pseudomonas aeruginosa* que son microorganismos no fermentadores y resistentes a distintos grupos de antimicrobianos (López et al, 2010).

Debido a la modificación genética, las RAM puede desarrollarse con el tiempo, pero la situación puede empeorar o aparecer antes por factores como: uso inadecuado y excesivo de estos medicamentos, dificultad para acceder a fuentes de agua limpia y falta de saneamiento adecuado, escasas o ineficaces medidas de control y prevención, inexistentes programas de capacitación comunitaria , incumplimiento de las leyes establecidas, inadecuada calidad y disponibilidad de diagnósticos, vacunas o medicamentos (WHO, 2020).

2.14. Tipos de resistencia bacteriana

Tabla 2-2: Tipos de resistencia bacteriana

Tipo de resistencia	Características
Natural	Todas las bacterias de una misma especie son resistentes a un mismo tipo de antibiótico. Tienen ventaja competitiva respecto a otras cepas. Pueden sobrevivir ante la presencia del antibiótico al cual presentan resistencia.
Adquirida	Se detecta mediante pruebas de sensibilidad. Pone en manifiesto el fracaso de la terapia antimicrobiana La resistencia aparece por mutaciones y por transmisión de material genético. El primer caso la transmisión de la resistencia pasa de generación en generación, después se da mediante plásmidos.

Fuente: Fernández, F. Resistencia bacteriana, 2015.

Realizado por: Landa, Diana, 2022.

En la tabla 2-2, se hace referencia a la resistencia natural y adquirida, mismas que presentan diferencias con respecto a su sensibilidad. El aislamiento de las bacterias demostrará resistencia

a varios grupos de antibióticos, dentro de las principales bacterias multirresistentes se encuentran (Hernández & Leiva, 2015, p. 50). *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterobacteria*, *Enterococcus*, *Acinetobacter baumannii*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Pseudomonas aeruginosa*.

2.14.1. Factores que generan resistencia

La Organización Mundial de la Salud en 2020 expresó que, ciertos microorganismos resistentes pueden transmitirse fácilmente por medio de aire, suelo y agua contaminada, mantenerse al tanto sobre los factores que generan resistencia antibiótica es esencial hoy en día.

Los factores más importantes que generan resistencia a los antibióticos son: uso irracional de antibióticos; nulo acceso a fuentes de agua potable, malas condiciones de higiene y saneamiento que abarca a animales como para personas; poco conocimiento acerca de cuidado y prevención de enfermedades; acceso restringido a una atención hospitalaria; falta de conocimiento sobre riesgos de la automedicación (Calderón & Aguilar, 2016, pp. 2-7).

2.15. Mecanismos de resistencia bacteriana

Los mecanismos de resistencia mejor estudiados incluyen: cambios en proteínas de la membrana externa, bombas de eflujo inespecíficas, producción de enzimas tipo β -lactamasa y modificaciones del sitio blanco. Los tres primeros mecanismos han sido bien descritos en bacterias gram negativas mientras que el último en bacterias gram positivas y casos puntuales en bacterias gram negativas.

La adquisición de estos mecanismos origina que la resistencia con frecuencia sea cruzada. La resistencia bacteriana ya sea natural o adquirida presenta tres mecanismos básicos (Perez & Robles, 2016, p. 189).

- **Inactivación del antibiótico por destrucción o por modificación de la estructura química:** Es un proceso molecular donde las enzimas destruyen la estructura química, unas de las más conocidas son las betalactamasas que hidrolizan el núcleo betalactámico y rompen el enlace amida, otro ejemplo es la eritromicina esterasa que se encarga de catalizar la hidrólisis del anillo de lactona del antimicrobiano.
- **Alteración del sitio blanco del antibiótico:** Se basa en la modificación de sitios específicos en la bacteria como la pared, la membrana celular, las subunidades del ribosoma 50S o 30S, etc.

- **Alteración en las barreras de permeabilidad:** Este mecanismo consiste en realizar cambios a nivel de los receptores específicos para los antimicrobianos o a su vez por alteraciones en la estructura de la membrana o pared bacteriana que se encargan de la permeabilidad celular y del transporte activo a través de la membrana.

2.16. Prevención de la resistencia bacteriana

Actualmente existen varias estrategias para disminuir la resistencia de las bacterias, como por ejemplo (Fernández et al., 2015, p. 47):

- Fomentar el uso racional de los antibióticos mediante la educación al personal de salud y la población.
- Establecer programas de vigilancia en los países para detectar la aparición de nuevas cepas resistentes
- Fomentar el uso racional de antibióticos en la medicina veterinaria
- Realizar una rotación cíclica de los antibióticos en las unidades de salud para reducir la resistencia a los antimicrobianos
- Dar un cumplimiento estricto en cuanto a las medidas de control y prevención de las infecciones intrahospitalarias

CAPÍTULO III

3. METODOLOGÍA

Para el desarrollo del presente trabajo investigativo se realizó una revisión bibliográfica previa a la investigación para confirmar los resultados obtenidos en el laboratorio. Se aplicaron técnicas de muestreo para aguas superficiales basada en la norma ISO/IEC 17025.

3.1. Tipo de investigación

3.1.1. *Enfoque de la investigación*

Se utilizó un enfoque de tipo cuantitativo y cualitativo, el primero se basó en que se tomó un número establecido de muestras al inicio, medio y final del caudal del río Chibunga, en diferentes tiempos. Se evaluaron parámetros microbiológicos con el fin de determinar bacterias potencialmente patógenas y la resistencia antibiótica que estas poseen. Nos centramos en la caracterización e identificación de las cepas bacterianas, mediante aislamiento hasta la obtención de cultivos puros, utilizando agares nutritivos, selectivos y diferenciales en los cuales se observó diferentes reacciones metabólicas según la especie, para la determinación de la resistencia se utilizó antibiogramas con diferentes discos de antibióticos para determinar la sensibilidad antimicrobiana.

3.2. Modalidad básica de la investigación

3.2.1. *Investigación de campo*

La recolección de las muestras para realizar el estudio, tuvo lugar en tres sitios diferentes del cauce del río Chibunga: el primero fue en el puente de la empresa Cemento Chimborazo, el segundo, en el parque Ecológico y el tercero en el puente de la entrada a Chambo, en base a las Normas NTE INEN 2 169: 98 y NTE INEN 2176, para la toma y el traslado de las muestras desde el punto de recolección al laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias.

3.2.2. *Investigación experimental*

Para determinar el tipo de bacterias presentes en las muestras tomadas de río y su resistencia se realizó una serie continua de pruebas dentro del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias, ESPOCH.

3.3. Criterios de inclusión y exclusión

3.3.1. Criterios de inclusión

- Muestras tomadas del caudal del Río Chibunga en diferentes puntos geográficos y fechas.
- Muestras recolectadas siguiendo los protocolos de bioseguridad.
- Muestras obtenidas en la mañana, sin la presencia de lluvia.
- Muestras transportadas en refrigeración.

3.3.2. Criterios de exclusión

- Muestras tomadas en las orillas de Río Chibunga en un solo sitio y fecha.
- Muestras recolectadas sin los protocolos de bioseguridad.
- Muestras obtenidas en la tarde y noche, con la presencia de lluvia
- Muestras transportadas a temperatura ambiente.

3.4. Ubicación de zona de muestreo

El muestreo se realizó partiendo de una zona con bajo índice de contaminación hasta una zona de mayor contaminación bacteriana. Para determinar las zonas de muestreo se tomó en cuenta tres sitios:

- Sitio 1. Empresa Cemento Chimborazo
- Sitio 2. Parque Ecológico
- Sitio 3. Entrada a Chambo

3.4.1. Población de estudio

Se analizaron las muestras tomadas a la largo del Río Chibunga, durante el período de mayo-julio 2022.

3.4.2. Obtención, manejo y conservación de muestra período mayo-julio 2022

A continuación se presenta el diagrama de la obtención, manejo y conservación de las muestras:

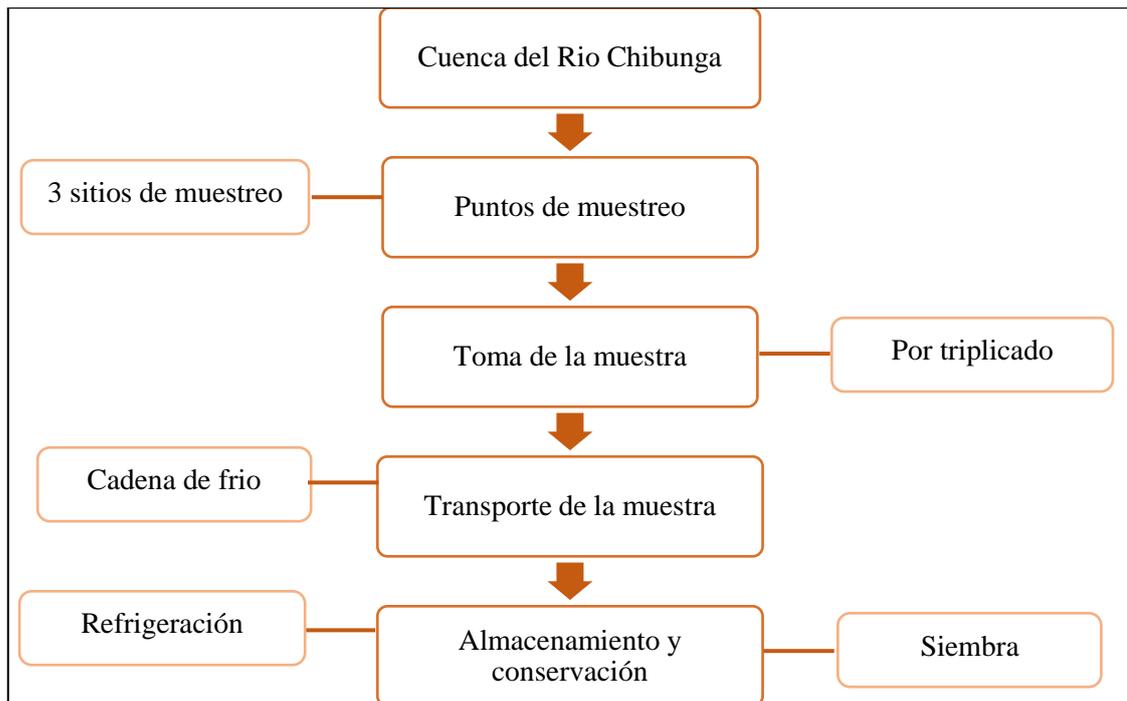


Ilustración 1-3: Obtención, manejo y conservación de muestra mayo-julio 2022

Fuente: (NTE INEN 2169, 2013, pp. 2-26).

Realizado por: Landa, Diana, 2022.

Se utilizaron frascos estériles de vidrio con capacidad de 300 ml. Se recogieron las muestras puntuales a lo largo del Rio Chibunga, para su posterior análisis. El volumen de muestra tomada fue de aproximadamente 250 ml, dejando un espacio de aire entre el agua y la tapa del frasco con el fin de evitar una contaminación accidental. Se rotuló cada envase con la siguiente información: Localización, fecha y hora de recolección y nombre de la persona que tomó la muestra

3.5. Manejo y conservación

3.5.1. Refrigeración y Transporte

Las muestras recolectadas para su posterior análisis fueron transportadas en una hielera a una temperatura de 2 °C - 5 °C, con hielos especiales y libre de luz. Para realizar el análisis microbiológico, su conservación es bajo refrigeración por un tiempo máximo de ocho horas, evitando la contaminación cruzada.

3.6. Caracterización Microbiológica

A continuación se presenta el diagrama de la caracterización microbiológica:

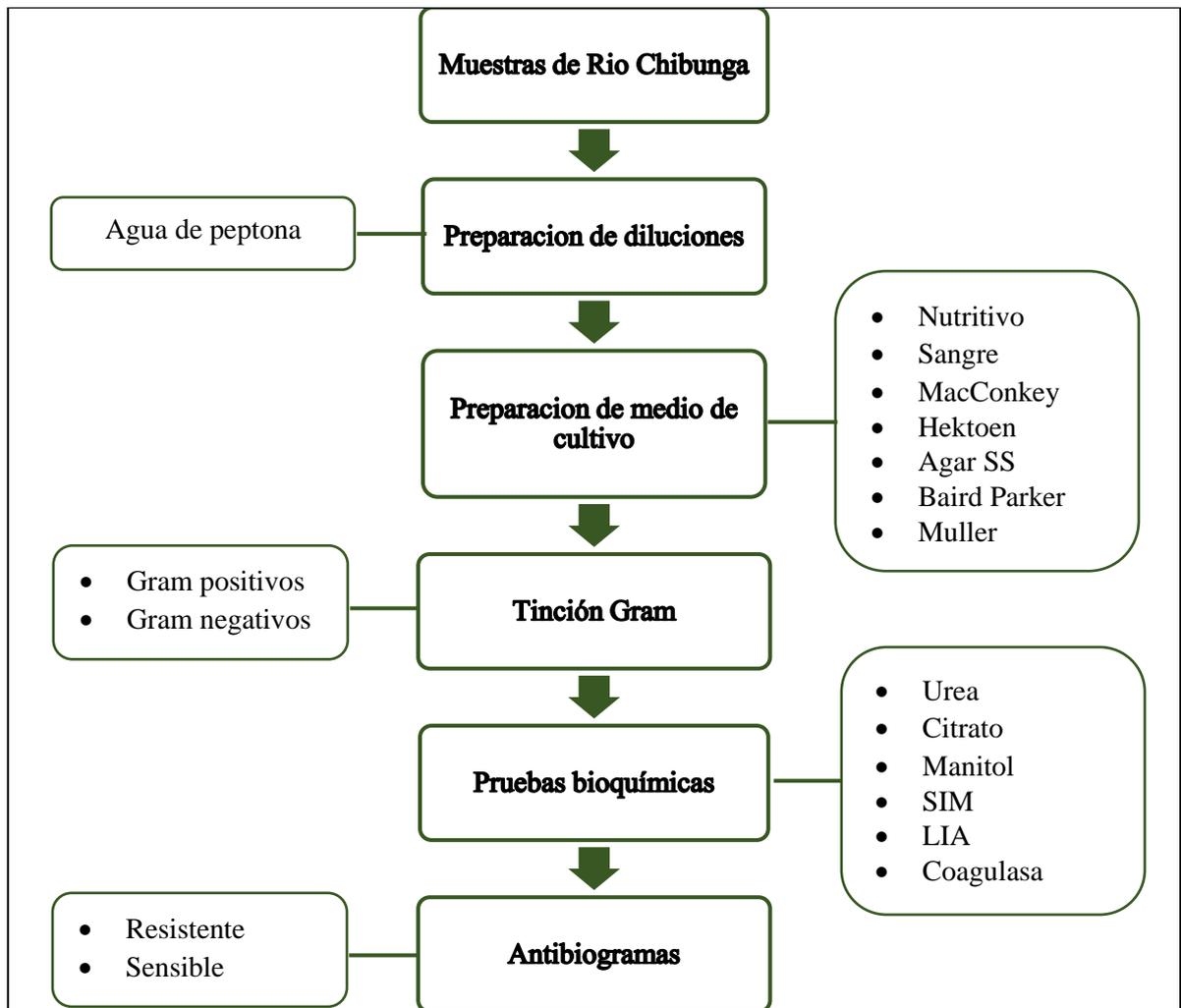


Ilustración 29-3: Aislamiento de microorganismos

Fuente: Fernández, 2010, pp. 4-52

Realizado por: Landa, Diana, 2022

3.7. Determinación de hongos

- En 1 litro de agua destilada suspender 65 gramos de agar Sabouraud, hervir de 2 a 5 minutos para disolver completamente el medio.
- Esterilizar a 121 °C durante 15 min.
- Cuando el medio se enfrié añadir el antibiótico diclofenaco, disolver y plaquear (Rodríguez y Zhurbenko, 2018. p. 73)

3.8. Determinación de coliformes fecales, totales y *E. coli*

A continuación se indica la determinación de coliformes fecales y totales:

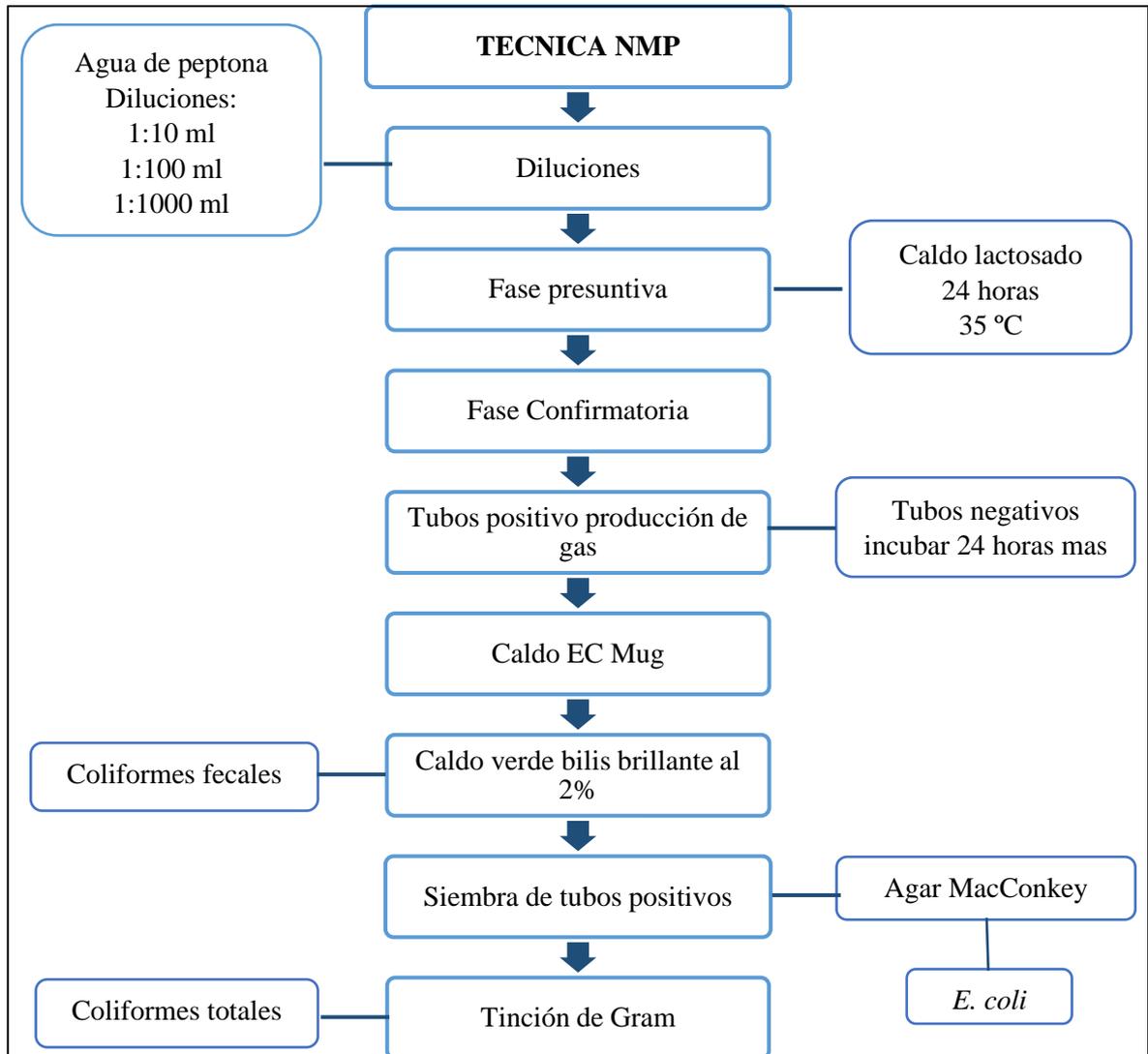


Ilustración 310-3: Determinación de coliformes fecales, totales y *E. coli*

Fuente: UNINET, 1987, pp. 8-10.

Realizado por: Landa, Diana, 2022.

3.9. Preparación de diluciones

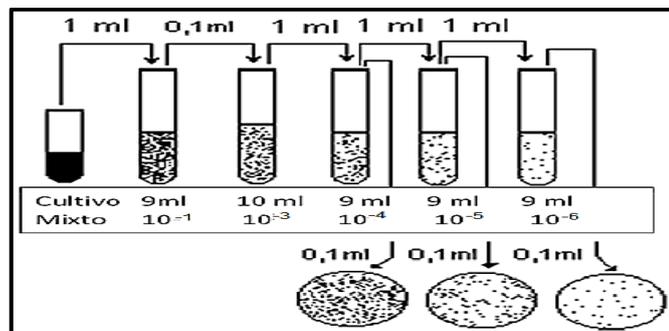


Ilustración 411-3: Diluciones seriadas

Fuente: Sanz, 2011, p.24

Para el aislamiento bacteriano, determinación de coliformes fecales, coliformes totales y confirmación de *Escherichia coli*, se realizó diluciones seriadas para lo cual se prepararon 9 tubos que contiene 9 ml de caldo nutritivo (agua de peptona), cada tubo se rotuló continuamente y en el primer tubo se agregó 1 ml de la muestra original obteniendo la dilución 1:10, luego se tomó 1 ml de esta dilución y se colocó en el segundo tubo, obteniendo la dilución 1:100, este proceso continuo hasta el noveno tubo con las diluciones restante. Finalmente, se tomó 1 ml de cada dilución preparada y se sembró en las respectivas cajas Petri que contenía agar nutritivo mismas que estaban rotulas de acuerdo con el número de dilución (Benavides et al. 2006. p 52)

3.10. Preparación de medios de cultivo

Para obtener el crecimiento de una gran variedad de especies bacterianas se preparó medios de cultivo nutritivos como fue el agar nutritivo y agar sangre, también se preparó medios de cultivo selectivos como agar MacConkey, agar SS, agar Hektoen y agar Baird Parker. Para la determinación de coliformes fecales y totales se preparó caldo lactosado, caldo EC Mug y caldo verde bilis brillante.

3.10.1. Agar Nutritivo y Agar Mc Conkey

- En una balanza analítica pesar los gramos de agar según el número de cajas que se van a preparar, colocar en un matraz Erlenmeyer y tapar con un corcho.
- Calentar a ebullición para disolver el agar por completo de 2 a 5 minutos.
- Para esterilizar colocar en la autoclave a 121°C durante 20 minutos
- Dejar enfriar el medio y plaquear en las cajas Petri, se debe realizar dentro de una cámara de flujo laminar para evitar contaminaciones con el medio

3.10.2. Agar Hektoen y agar Salmonella Shigella

- En un matraz Erlenmeyer disolver los gramos de cada agar en agua destilada según el número de cajas que se va a preparar, tapar con un corcho.
- El agar Hektoen y agar *Salmonella Shigella* no se esterilizan, hervir de 10 a 15 minutos.
- Dejar enfriar y plaquear dentro de una cámara de flujo laminar para evitar contaminaciones (Rodríguez y Zhurbenko, 2018. p. 105).

3.10.3. Agar Sangre

- En un matraz Erlenmeyer con un 1 litro de agua destilada disolver los gramos necesarios del

medio y tapar con un corcho.

- Calentar a ebullición para disolver el agar por completo de 2 a 5 minutos.
- Luego, esterilizar la disolución en la autoclave a 121 °C durante 20 minutos.
- Dejar enfriar en el baño maría a 45°C.
- Luego añadir la cantidad de sangre humana al 5%.
- Homogenizar y verter el medio en las cajas Petri (Vaz de Mello, 2013, p. 2).

3.10.4. Agar Baird Parker

- En un matraz Erlenmeyer disolver los gramos necesarios del medio de cultivo en 1 litro de agua destilada y tapar con un corcho.
- Calentar a ebullición para disolver el agar por completo de 2 a 5 minutos.
- Esterilizar en la autoclave a 121 °C durante 20 minutos.
- Llevar a baño maría la disolución.
- Adicionar 50ml de emulsión de yema de huevo estéril y 10 ml de Telurito de potasio
- Verter el medio en las cajas Petri, en una cámara laminar (Rodríguez y Zhurbenko, 2018. p. 133).

3.10.5. Medios líquidos (Caldo EC Mug, Caldo bilis verde brillante)

- Pesar el medio de cultivo según el número de tubos que se vayan a preparar, colocar en matraz Erlenmeyer con agua destilada y homogenizar.
- Con ayuda de una pipeta esterilizada colocar en cada tubo colocar 9ml de dilución, inmediatamente colocar los tubos Durham en cada tubo.
- Esterilizar por 20 minutos en la autoclave a 121 °C.
- Inocular la muestra madre en cada tubo para posteriormente llevar a incubación durante 24 horas a 37°C (Rodríguez y Zhurbenko, 2018. p. 191).

3.11. Aislamiento de bacterias

Para aislar correctamente y obtener un cultivo puro, se utilizó el método de siembra por agotamiento de microorganismos de un medio a otro, con la tinción gran se confirma si se tiene un cultivo para proceder hacer las pruebas bioquímicas (Luna, 2012, p. 6).

3.12. Tinción Gram

- Rotular un portaobjeto, realizar un círculo en el centro y colocar una gota de agua estéril.

- Con un asa estéril tomar una cantidad adecuada de colonias y distribuir dentro del círculo, formando un frotis.
- Colocar cristal violeta, esperar un minuto y lavar con agua durante 5 segundos.
- Luego, colocar Lugol y esperar un minuto, lavar con agua durante 5 segundos.
- Decolorar con alcohol-acetona al 95%, esperar 30 segundos y lavar con agua 5 segundos
- Finalmente, añadir safranina, esperar un minuto, lavar con agua corriente durante 5 segundos, dejar secar a temperatura ambiente.
- Colocar una gota de aceite de inmersión y observar con lente 100X (Ramírez et al., 2018, p. 38).

3.13. Preparación de pruebas bioquímicas

Después de la incubación de los microorganismos en los medios nutritivos se utilizaron varias pruebas bioquímicas con el fin de identificar las reacciones químicas que se dan entre el microorganismo y el sustrato (Lopardo, 2016, p. 71).

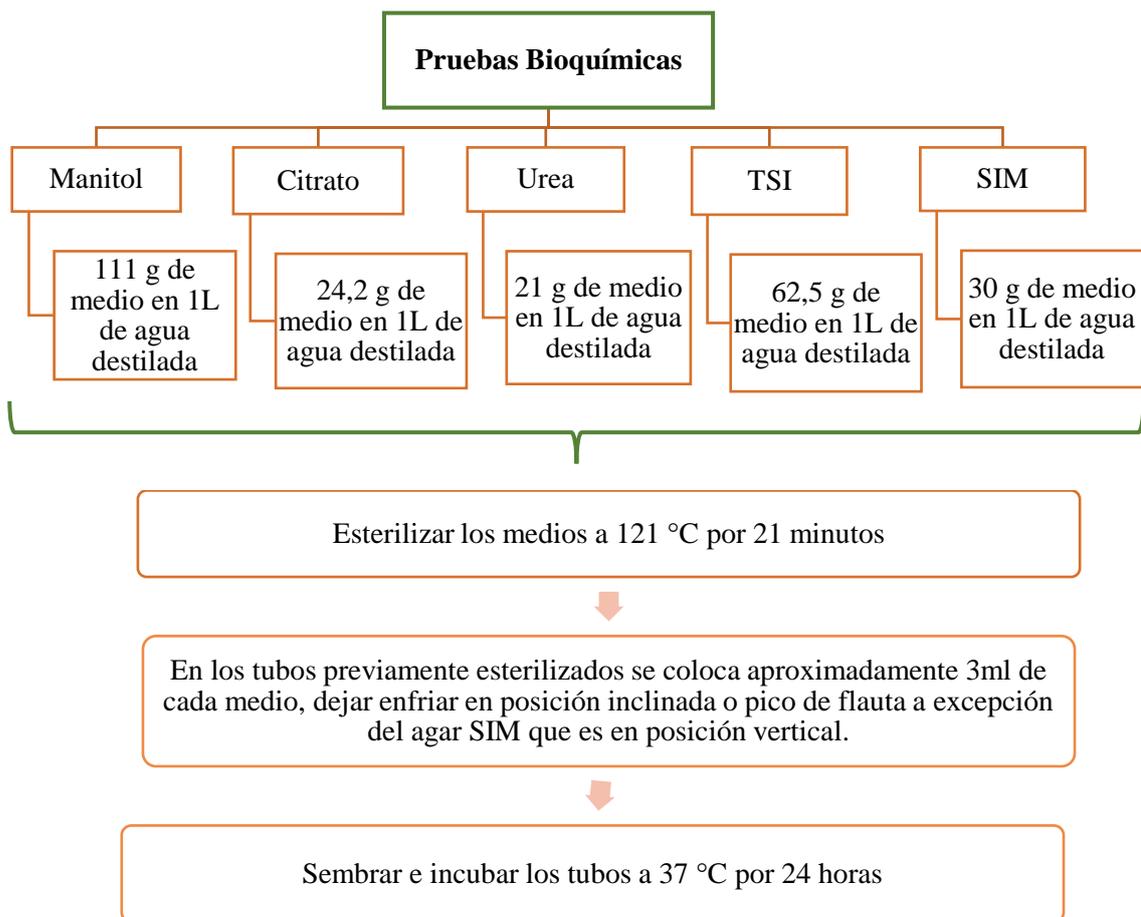


Ilustración 512-3: Procedimiento de pruebas bioquímicas

Fuente: Fuente: NTE INEN 1529-8 Primera revisión

Realizado por: Landa, Diana, 2022.

3.13.1. Prueba de Catalasa

- Con un asa bacteriológica estéril tomar una colonia, colocar en un portaobjetos y realizar un pequeño frotis.
- Posteriormente, colocar una gota de H₂O₂ al 30% y observar si hay o no la presencia de burbujas (Álvarez et al., 1990, p. 78).

3.13.2. Prueba de Oxidasa

- Con un asa bacteriológica estéril tomar una colonia, colocar en la zona reactiva de la tira que contiene N, N-dimetil-p-fenilendiamina (DMPD) y frotar.
- Interpretar el resultado después de 15 – 30 segundos
- Positivo: se torna azul a violeta azulado. Negativo: color rosado o sin cambio de color. (Cercenado y Cantón, 2010, p.33).

3.14. Preparación de Antibiogramas

- Con un asa bacteriológica estéril tomar colonias del microorganismo asilado e inocular en los tubos que contienen caldo Brain Heart Broth (cerebro corazón) e incubar a 37°C, cada 30 minutos observar cambios de turbidez.
- Cuando se observe la presencia de turbidez en el tubo, sumergir un hisopo de algodón estéril, eliminar el exceso.
- Inocular sobre toda la superficie de la placa de Petri que contiene agar Müller
- Con ayuda de una pinza estéril colocar los discos de antibióticos en la superficie del agar.
- Incubar a 37°C durante 24 horas (Sanz. 2011, pp. 45-46).

3.15. Materiales

- Asas bacteriológicas
- Algodón
- Bolsas para esterilización
- Cajas Petri de vidrio
- Corchos
- Frascos estériles
- Gradillas
- Matraz Erlenmeyer

- Mecheros de alcohol
- Papel aluminio
- Peras de succión
- Pipetas estériles
- Probetas
- Puntas para micropipetas
- Reverbero
- Toallas de papel
- Tubos de ensayo
- Tubos Durham
- Vasos de precipitación

3.16. Reactivos

- | | |
|-----------------------|-----------------------------|
| • Agua destilada | • Lugol |
| • Agua oxigenada | • Reactivo de Kovacs |
| • Aceite de inmersión | • Safranina |
| • Ácido sulfúrico | • Sangre desfibrinada al 5% |
| • Alcohol potable | • Sulfato de sodio |
| • Alcohol cetona | • Suero fisiológico |
| • Cloruro de bario | • Telurito de potasio |
| • Cristal violeta | • Triptona |
| • Etanol | • Urea al 40% |

3.17. Medios de cultivo

- | | |
|-----------------------------------|-------------------------------|
| • Agar Baird Parker | • Agar SIM |
| • Agar Hecktoen | • Agar TSI |
| • Agar MacConkey | • Agar citrato de Simmos |
| • Agar manitol salado | • Agar LIA |
| • Agar Mueller Hinton | • Caldo verde bilis brillante |
| • Agar Nutritivo | • Caldo EC |
| • Agar <i>Salmonella Shigella</i> | • Caldo EC Mug |
| • Agar soya tripticasa | • Caldo lactosado |
| • Agar urea | • Caldo cerebro corazón |

3.18. Equipos

- Autoclave
- Balanza analítica
- Baño maría
- Cámara de flujo laminar
- Estufa
- Microscopio óptico
- Pipeta automática
- Refrigerador

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Toma de muestra

Se seleccionaron al azar tres puntos para la toma de muestra, considerando zonas con menor y mayor población, debido a que cuanto mayor sea la población aledaña al río, mayor será la contaminación por las actividades sean agrícolas, ganaderas o industriales que se realizan, así como también por los desperdicios que se echan al río sin un tratamiento previo.

Tabla 1-4: Datos de temperatura y pH obtenidos de las muestras tomadas del Río Chibunga

Sitio de muestra	T° Ambiente	T° agua	pH
<i>Empresa Cemento Chimborazo</i>	17°C	12°C	8,5
<i>Parque Ecológico</i>	22°C	15°C	8
<i>Puente de la entrada a Chambo</i>	20°C	13°C	7.5

Realizado por: Landa, Diana, 2022.

En la tabla 1-4 se detalla la temperatura y el pH de los tres puntos de muestreo a lo largo del río Chibunga, la temperatura ambiente va de 17°C a 22°C, la temperatura del agua tiene una ligera variación de 12 °C a 15°C, por otro lado, el pH es levemente alcalino 7.5 a 8.5. La mayoría de las bacterias de importancia clínica prefieren un rango de temperatura entre 20 y 45°C, a altas temperaturas (>65°C) se da el proceso de desnaturalización de la estructura bacteriana y a temperatura menor de 5°C se retarda o suspende el crecimiento bacteriano.

El pH del agua en condiciones normales es neutro, siendo una ventaja para las bacterias patógenas ya que tienden a crecer en un pH entre 4 y 9. Además, las bacterias suelen crecer en ambientes donde hay mucha agua disponible, es decir, que haya una alta actividad de agua (Aw). El medio acuático es muy susceptible a la contaminación bacteriana y tiende a ser un portador bacteriano potencial al tener contacto con el suelo y productos cultivados (OPS. 2015. p.2).

4.2. Parámetros microbiológicos

A partir de la identificación microbiológica de las muestras recolectadas y analizadas en el periodo mayo – agosto 2022 se aislaron 12 bacterias de importancia clínica; para las cuales se realizaron múltiples siembras que varían de 8 a 10, hasta obtener finalmente un cultivo puro, una

vez que las características fenotípicas de las colonias ya no variaban y seguían perpetuándose en las siembras posteriores, se confirmaba la obtención de un aislamiento puro mediante la aplicación de una tinción gram.

4.2.1. Colonias puras

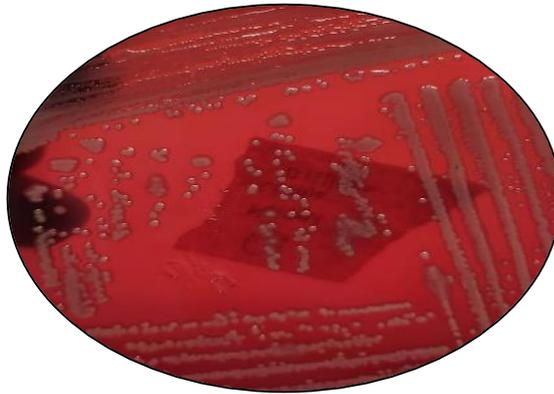


Ilustración 1-4: *E. coli* en agar sangre

Realizado por: Landa, Diana, 2022.

Fuente: Laboratorios de microbiología, ESPOCH.



Ilustración 2-4: *E. coli* en agar MacConkey

Realizado por: Landa, Diana, 2022.

Fuente: Laboratorios de microbiología, ESPOCH.

En la figura 1-4 se observa el crecimiento de *Escherichia coli* en agar sangre, se presentan colonias blancas, circulares, tamaño mediano a grande (de 2mm a 4mm), superficie brillante, densidad opaca y elevación convexa. En la figura 2-4 se evidencian las características morfológicas de *E. coli* aisladas en agar MacConkey, se observa un crecimiento de colonias redondas, por la producción de ácidos debido a la fermentación de la lactosa el ph desciende y el medio adquiere un color rosa pálido que contrasta el color fucsia inicial (Gonzales. 2013. p.12)



Ilustración 3-4: *E. coli* en agar Hektoen

Realizado por: Landa, Diana, 2022.

Fuente: Laboratorios de microbiología, ESPOCH.

En la figura 3-4, se evidencia el crecimiento de *E. coli* debido al cambio de color original del agar Hektoen de verde a color salmón, las colonias son redondas.

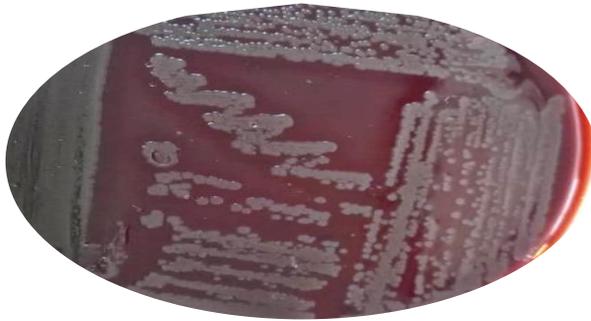


Ilustración 4-4: *E. faecalis* en agar Sangre

Realizado por: Landa, Diana, 2022.

Fuente: Laboratorio de microbiología, ESPOCH.



Ilustración 5-4: *Y. enterocolitica* en agar Sangre

Realizado por: Landa, Diana, 2022.

Fuente: Laboratorio de microbiología, ESPOCH.

En la figura 4-4 las colonias de *Enterococcus faecalis* en agar Sangre son opacas de color blanco o crema, de 1-2 mm, lisas con borde uniforme. En la figura 5-4 se observa las colonias de *Yersinia enterocolitica* en agar Sangre, se presentan de color blanco de tamaño de 3-4 mm de diámetro, con un aspecto brillante.

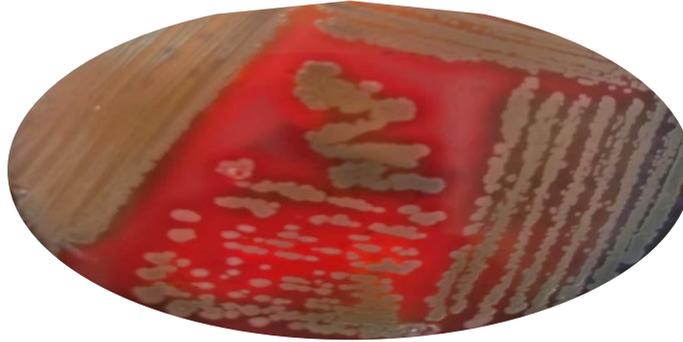


Ilustración 6-4: *K. pneumoniae* en agar Sangre

Realizado por: Landa, Diana, 2022.

Fuente: Laboratorio de microbiología, ESPOCH.

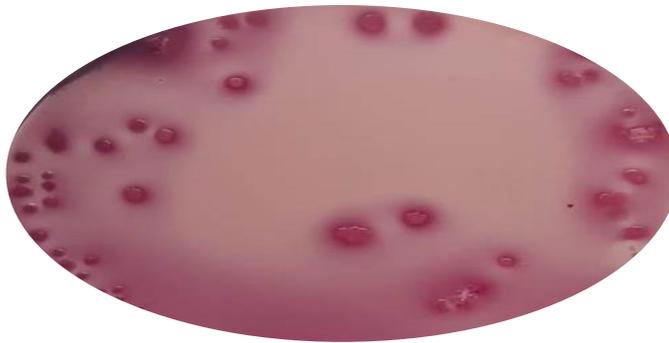


Ilustración 7-4: *K. pneumoniae* en agar MacConkey

Realizado por: Landa, Diana, 2022.

Fuente: Laboratorio de microbiología, ESPOCH.

En la figura 6-3, *Klebsiella pneumoniae* presenta una formación de colonias grandes de aspecto cremoso brillante, bordes regulares con características alfa hemolíticas. En la figura 7-4, *Klebsiella pneumoniae* en agar MacConkey, las colonias son grandes, redondas, mucoides y de color rosado debido a que fermentan la lactosa



Ilustración 8-4: *S. entérica* en agar Hektoen

Realizado por: Landa, Diana, 2023.

Fuente: Laboratorio de microbiología, ESPOCH.



Ilustración 9-4: *S. entérica* en agar SS

Realizado por: Landa, Diana, 2022.

Fuente: Laboratorio de microbiología, ESPOCH.

Se observa el crecimiento de *Salmonella entérica* en agares diferentes, en la figura 8-4 las características morfológicas en agar Hektoen se observa un crecimiento de colonias negras pequeñas y circulares. En la figura 9-4, *S. entérica aislada en agar SS* las colonias son circulares, adquieren el color del medio de cultivo (amarillo opaco).



Ilustración 10-4: *S. paratyphi* en agar SS

Realizado por: Landa, Diana, 2022.

Fuente: Laboratorio de microbiología, ESPOCH



Ilustración 11-4: *Shigella flexneri* en agar SS

Realizado por: Landa, Diana, 2022.

Fuente: Laboratorio de microbiología, ESPOCH.

Se evidencia el crecimiento de bacterias de diferente género en un mismo agar que es el SS. En la figura 10-4, están colonias negras de *Salmonella paratyphi*, el color característico se debe a la producción de ácido sulfhídrico. Por otro lado, en la figura 11-4 se observa colonias aisladas de *Shigella flexneri*, no produce gas de ácido sulfhídrico ni fermenta lactosa por lo cual las colonias no presentan color.



Ilustración 12-4: *P. mirabilis* en agar MacConkey

Realizado por: Landa, Diana, 2022.

Fuente: Laboratorio de microbiología, ESPOCH.



Ilustración 13-4: *P. aeruginosa* en agar Sangre

Realizado por: Landa, Diana, 2022.

Fuente: Laboratorio de microbiología, ESPOCH.

En la figura 12-4, se observa que no hay cambio de color en el agar MacConkey, es indicativo que no fermenta lactosa y hace referencia al crecimiento de colonias de *Proteus mirabilis*, mismas que presentan un color beige. Se evidencia el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* en la figura 13-4, las colonias en agar sangre redondas, mucosas y rodeadas de un halo verdoso debido a la α -hemólisis, proceso que se da por la lisis parcial de los eritrocitos.



Ilustración 14-4: *Aeromonas hydrophila* en agar Sangre

Realizado por: Landa, Diana, 2022.

Fuente: Laboratorio de microbiología, ESPOCH.

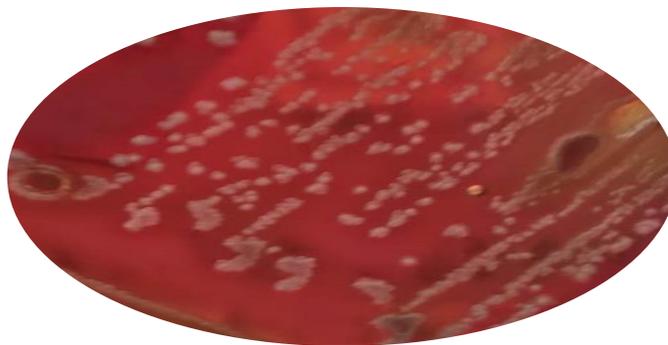


Ilustración 15-4: *Edwardsiella tarda* en agar Sangre

Realizado por: Landa, Diana, 2022.

Fuente: Laboratorio de microbiología, ESPOCH

En la figura 14-4 se observa el crecimiento de *Aeromonas hydrophila* en agar sangre, las colonias son redondeadas, de color beige, lisas y convexas. En la figura 15-4, *Edwardsiella tarda* presenta formación de colonias de aspecto cremoso, bordes irregulares y superficie lisa, con un tamaño que varía de 2 a 3 mm.



Ilustración 16-4: *S. aureus* en agar Sangre

Realizado por: Landa, Diana, 2022.

Fuente: Laboratorio de microbiología, ESPOCH.

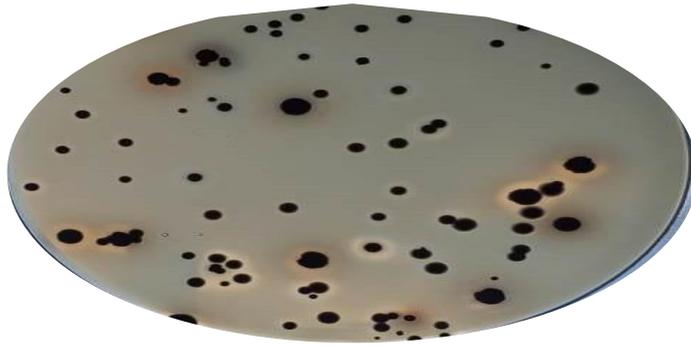


Ilustración 1713-4: *S. aureus* en agar Baird-Parker

Realizado por: Landa Diana, 2022.

Fuente: Laboratorio de microbiología, ESPOCH.

En la figura 16-4 las colonias de *Staphylococcus* en agar Sangre son grandes, redondas, de color blanco, opacas o cremosas, tamaño de 2 a 3 mm de diámetro, borde circular y elevación convexa, también se observa un halo transparente alrededor de las colonias haciendo referencia a la β -hemólisis que es la destrucción total de los glóbulos rojos (Sanchez & Merchán. 2018. p. 21)

En la figura 17-4 se observa el crecimiento de colonias típicas de *Staphylococcus aureus* sobre agar Baird-Parker, las características morfológicas son: color negras, redondas con bordes lisos, convexas, tamaño de 2-3 mm de diámetro, brillantes, rodeadas de un halo claro que varía de tamaño.

El uso de agares selectivos como MacConkey, Baird-Parker, SS y Hektoen permitieron la identificación de las bacterias de acuerdo con las características morfológicas que presentaban las colonias. El agar sangre al ser un medio de enriquecimiento fue el más utilizado para aislar las bacterias y obtener un cultivo puro.

La contaminación de los ríos a nivel nacional y mundial es un problema que incide directamente en la salud humana puesto que los microorganismos presentes en medios acuáticos son causantes de diversas enfermedades, por tal motivo se han realizado estudios tanto físicos, químicos y microbiológicos para determinar la calidad del agua de los diferentes ríos que hay en nuestro país.

En un estudio realizado por Baquerizo en el año 2019, que considera los parámetros fisicoquímicos y bacterianos, los ríos más contaminados del Ecuador fueron el río Guayas y Machangara, ya que los niveles de *E. coli*, coliformes fecales y totales en sus afluentes excedieron los límites permisibles. La temperatura ambiente, la ubicación geográfica y el alto índice de aguas residuales sin tratar conducen a la proliferación de bacterias de importancia clínica en las aguas superficiales.

La calidad del agua disminuye drásticamente por la elevada concentración de bacterias provenientes de la flora bacteriana saprofita de los intestinos de humanos y animales, como son coliformes totales y fecales, *Escherichia coli*, bacterias mesófilas y *Streptococcus faecalis*. El desarrollo y reproducción de estas bacterias patógenas ocurre debido a las condiciones adecuadas de temperatura, pH, oxígeno y nutrientes presentes en el agua. El manejo inadecuado de las aguas grises y servidas puede provocar el crecimiento de las bacterias *Edwardsiella* y *Klebsiella*. Bacterias del género *Shigella* y *Salmonella* son causantes de disentería bacilar. Las bacterias gram positivas no son muy comunes en fuentes de agua, pero se han identificado *Staphylococcus aureus* en ecosistemas acuáticos que presentan resistencia a ciertos antibióticos (Ríos et al., 2017, pp. 236-247).

En Lima en el año 2019 se realizó un estudio para determinar la presencia de bacterias patógenas en las aguas del río Surco mismo que desemboca en las playas de esta ciudad, los resultados arrojaron una elevada concentración bacteriana en todos los puntos de muestreo, se aislaron Enterobacterias como son: *Escherichia coli*, *Kebsiella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila*, y *Salmonella sp* (Osoreo et al. 2009, p 244).

4.2.2. Tinción Gram

Una vez aplicada la tinción Gram a los aislamientos puros, se observó la presencia de una organización de microorganismos que presentaron una sola forma, tamaño y color, 10 de estos microorganismos se identificaron como bacilos Gram negativos, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, *Pseudomona* y *Aeromanas*, mientras que dos de los aislamientos puros evidenciaba presencia de cocos gram positivos, perteneciente a la familia *Staphylococcaceae* y *Enterococcus*.

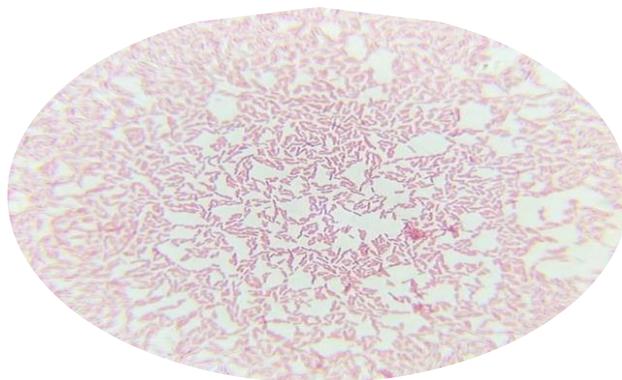


Ilustración 1814-4: *E. coli*, bacilo gram negativo

Realizado por: Landa, Diana, 2022.

Fuente: Laboratorios de microbiología, ESPOCH

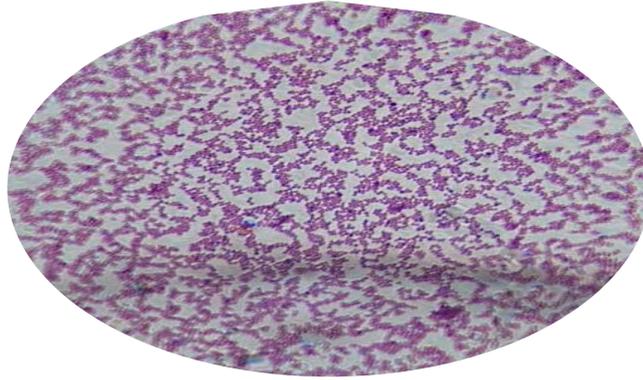


Ilustración 19-4: *S. aureus* cocos gram positivos

Realizado por: Landa, Diana, 2022.

Fuente: Laboratorios de microbiología, ESPOCH.

En el campo óptico de la figura 18-4 se observa la presencia de bacilos Gram (-) cortos no esporulados de *Escherichia coli*. En contraste en figura 19-4 se observa una agrupación en forma de cadena, racimo o en parejas de cocos Gram (+) perteneciente a *Staphylococcus aureus*.

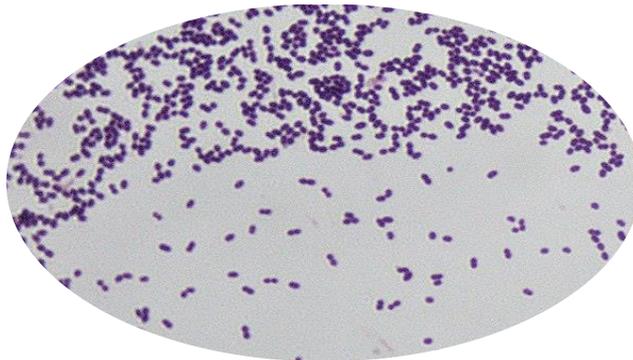


Ilustración 20-4: *E. faecalis* cocos Gram positivos

Realizado por: Landa, Diana, 2022.

Fuente: Laboratorio de microbiología, ESPOCH.

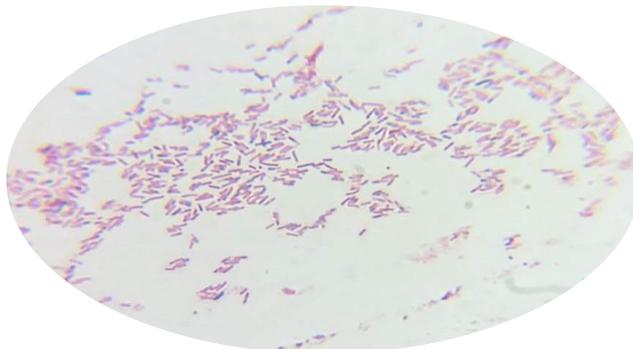


Ilustración 21-4: *Y. enterocolitica* en bacilos Gram negativo

Realizado por: Landa, Diana, 2022.

Fuente: Laboratorio de microbiología, ESPOCH

En la figura 20-4 se observa cocos Gram (+) agrupados en parejas perteneciente a *Enterococcus faecalis*. Se aprecia *Yersinia enterocolitica* en la figura 21-4 en forma de bacilos Gram (-) agrupados y dispersos.

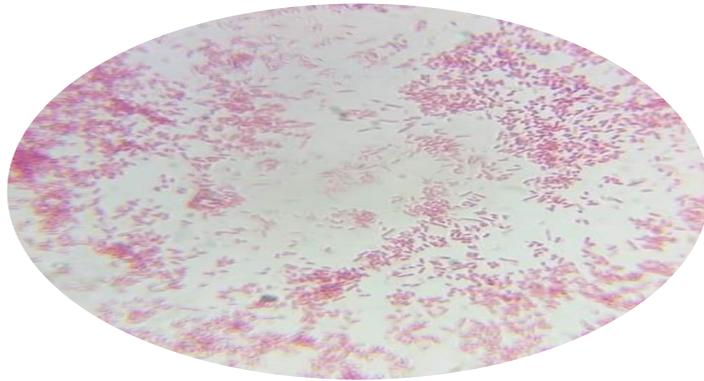


Ilustración 22-4: *K. pneumoniae* bacilo Gram negativo

Realizado por: Landa, Diana, 2022.

Fuente: Laboratorio de microbiología, ESPOCH.

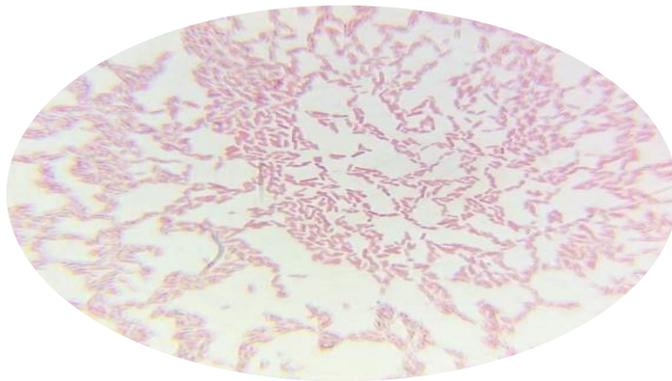


Ilustración 23-4: *S. entérica* bacilos Gram negativo

Realizado por: Landa, Diana, 2022.

Fuente: Laboratorio de microbiología, ESPOCH

En la figura 22-4, en el campo óptico de *Klebsiella pneumoniae*, se observa la presencia de bacilos cortos Gram (-) agrupados. En el campo óptico de *Salmonella entérica*, la figura 23-4, se observan bacilos Gram (-) no esporulado.

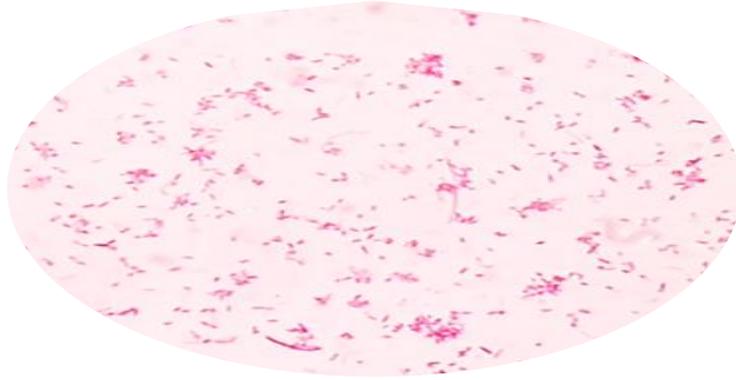


Ilustración 24-4: *S. paratyphi* bacilo Gram negativo

Realizado por: Landa, Diana, 2022.

Fuente: Laboratorio de microbiología, ESPOCH.

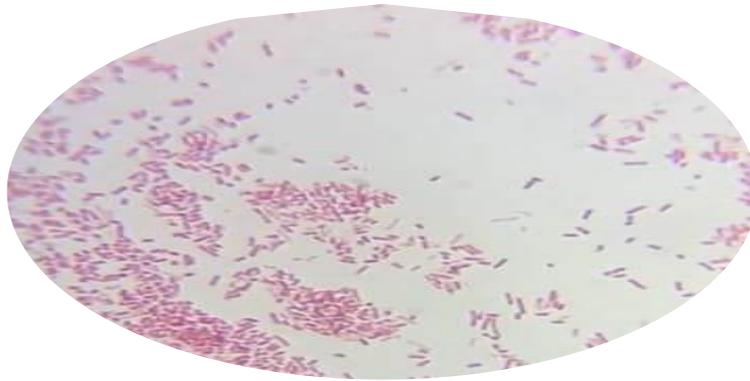


Ilustración 25-4: *Shigella flexneri* bacilo Gram negativo

Realizado por: Landa, Diana, 2022.

Fuente: Laboratorio de microbiología, ESPOCH.

En el campo óptico de *Salmonella paratyphi*, figura 24-4 se observan bacilos Gram (-) dispersos. En la figura 25-4, en el campo óptico de *Shigella flexneri* se aprecia la presencia de pequeños bacilos Gram (-) agrupados y dispersos.

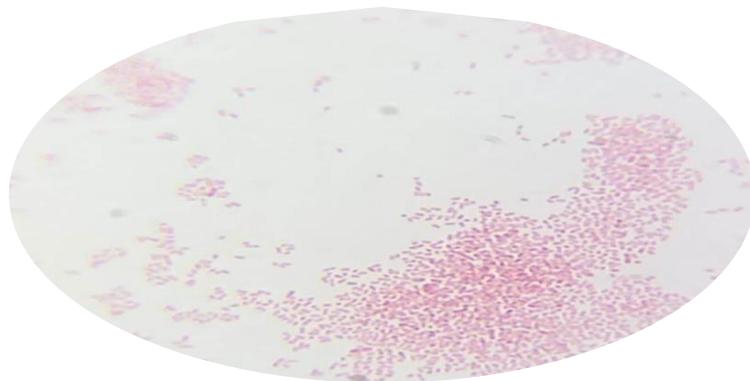


Ilustración 26-4: *Proteus mirabilis* bacilos Gram negativo

Realizado por: Landa, Diana, 2022.

Fuente: Laboratorio de microbiología, ESPOCH.

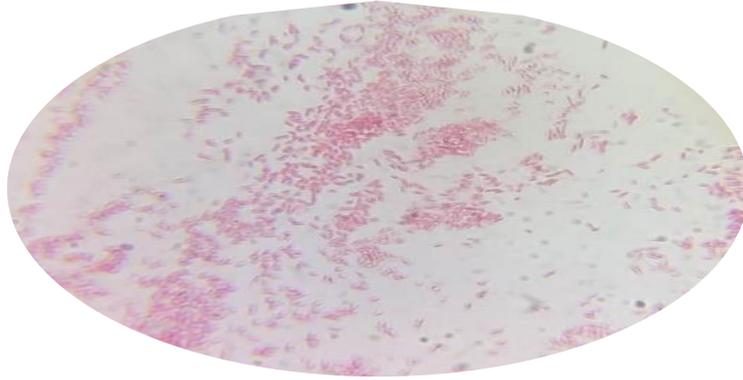


Ilustración 27-4: *P. aeruginosa* bacilos Gram negativo

Realizado por: Landa, Diana, 2022.

Fuente: Laboratorio de microbiología, ESPOCH.

En la figura 26-4, se observa en el campo óptico *Proteus mirabilis* bacilos Gram (-) cortos, agrupados y dispersos. En el campo óptico de *Pseudomonas aeruginosa*, figura 27-4 se observan bacilos cortos Gram (-) ligeramente curvado, en su mayoría agrupados.

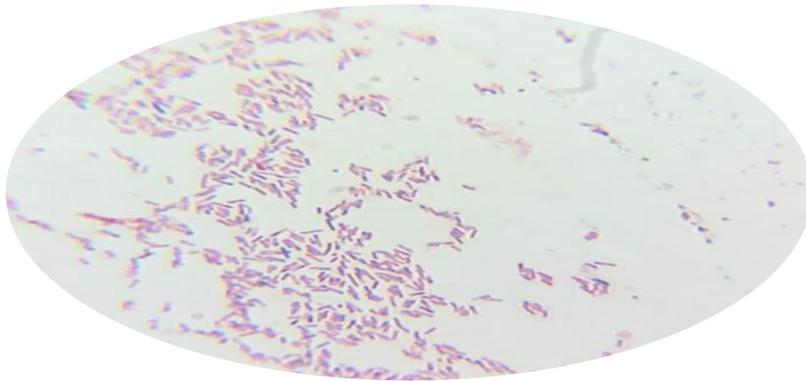


Ilustración 28-4: *Aeromonas hydrophila* bacilo Gram negativo

Realizado por: Landa, Diana, 2022.

Fuente: Laboratorio de microbiología, ESPOCH.

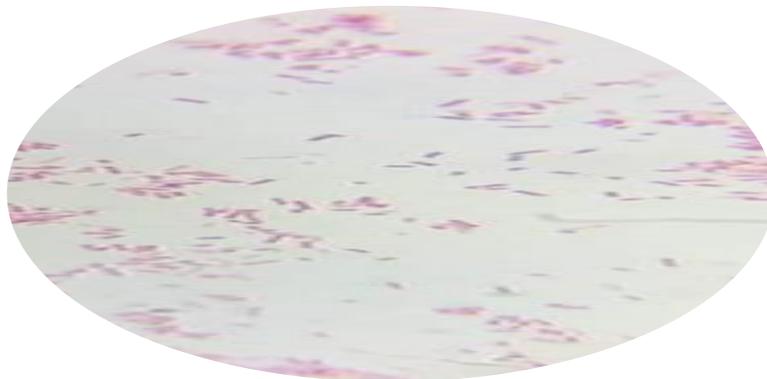


Ilustración 29-4: *Edwardsiella tarda* bacilos Gram negativo

Realizado por: Landa, Diana, 2022.

Fuente: Laboratorio de microbiología, ESPOCH.

En la figura 28-4, se observa en el campo óptico *Aeromonas hydrophila* bacilos Gram (-) largos y rectos. En la figura 29-4, *Edwardsiella tarda* bacilos Gram (-) dispersos. La tinción de gram fue creada en el año 1884 por Christian Gram, es una técnica importante dentro de los laboratorios de microbiología y es esencial para la correcta interpretación de los resultados. Es muy utilizada debido a su bajo costo, sencillez y eficacia, se define como una tinción diferencial ya que clasifica a las bacterias en dos grupos; las gram negativas adquieren un color lila y gram positivas que toman un color rosa. El principio de esta técnica se basa en las diferencias de la estructura y composición de la pared celular de las bacterias (López et al., 2013. p. 12).

De las bacterias aisladas; diez son bacilos gram negativos pertenecientes en su mayoría a la familia Enterobacteriaceae y dos son cocos gram positivos. Molina y Orozco (2019), aislaron e identificaron 9 bacterias de interés clínico pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae (bacilos gram negativos) y *Enterococcus spp* en muestra tomadas del río Chambo. En muestras analizadas del río Chanchán por Atiaja y Ramirez (2019) identificaron *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Morganella morganii*, *Citrobacter diversus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

4.2.3. Pruebas Bioquímicas

Para la identificación de bacterias aisladas en las muestras tomadas del río Chibunga se utilizaron diferentes pruebas bioquímicas que determinó las características metabólicas de las bacterias.

Tabla 2-4: Resultados de pruebas bioquímicas para bacterias cocos gram (+)

Bacteria	Catalasa	Coagulasa	Manitol	Hemólisis
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	+	β
<i>Enterococcus faecalis</i>	-		+	γ

Fuente: Álvarez et al., 1990, p.48-50

Realizado por: Landa, Diana, 2022.

Para cocos gram positivos como prueba preliminar se utilizó la catalasa para distinguir *Staphylococcus* que son catalasa positiva y *Enterococcus* catalasa negativa, para establecer a que especie pertenece *Staphylococcus* se realizó la prueba de la coagulasa siendo positiva sólo para *Staphylococcus aureus*, se realizó la prueba de manitol que fue positivo para ambos géneros.

Para determinar a qué especie pertenece *Enterococcus* se identificó el tipo de hemólisis siendo tradicional γ -hemólisis para *Enterococcus faecalis* misma que se caracteriza por la ausencia de

halo alrededor de las colonias. Estos resultados son respaldados por el Manual de Técnicas en Microbiología Clínica de Álvarez.

Tabla 3-4: Resultados de pruebas bioquímicas e identificación bacteriana para bacilos gram (-)

Bacteria	Glucosa	SH2	Lactosa	Gas/ Glucosa	Citrato	Indol	Manito	Movilidad	Urea	LIA
<i>Escherichia coli</i>	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	+	-	-	-	-	V	+	-	+	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	-	+	+	+	-	+	-	+	
<i>Salmonella entérica</i>				-	-	-	-	-	+	+
<i>Salmonella paratyphi</i>	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+
<i>Shigella flexnery</i>	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+
<i>Proteus mirabilis</i>		+	-	+	-	+	-	+	+	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		-	-	+	+	-	V-	-	+	
<i>Aeromonas hydrophila</i>				+	-	+		+	-	
<i>Edwardsiella tarda</i>	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+

Fuente: Álvarez et al., 1990, pp.74-78.

Realizado por: Landa, Diana, 2022.

Los microorganismos que son bacilos gram positivos pueden ser aerobios y anaerobios facultativos es decir que pueden o no depender del oxígeno. Para identificar a qué bacterias pertenecen los cultivos puros se realizó una serie de pruebas bioquímicas, los resultados obtenidos fueron comparados con el Manual de Técnicas de Microbiología Clínica propuesto por Álvarez y Bouquet en el año 1990. Las bacterias identificadas fueron las siguientes: *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella entérica*, *Salmonella paratyphi*, *Shigella flexnery*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Aeromonas hydrophilas* y *Edwardsiella tarda*.

Para clasificar a las bacterias según su género y especie se utilizó pruebas bioquímicas que permiten determinar las características fisiológicas más específicas, ya que presentan una actividad metabólica distinta para cada bacteria. La prueba de manitol es utilizada para diferenciar los microorganismos capaces de fermentar el manitol, se evidencia porque el medio toma un color amarillo intenso debido a la gran cantidad de ácidos que liberan las bacterias mismas que son

detectadas por el indicador rojo fenol. La ureasa es una prueba esencial para identificar enterobacterias, los microorganismos tienen la capacidad de desnaturalizar la urea por acción de la enzima ureasa cambiando el color rosa original del medio a un color amarillo (Cervera. 2011, p.1-2).

El citrato es utilizado para evidenciar la presencia de la enzima citrato permeasa en donde el color verde original del medio cambia a un color azul. La prueba de LIA permite reconocer si la bacteria presenta la enzima lisina descarboxilasa que fermenta la glucosa, cambiando de color púrpura a un color amarillo. La prueba de SIM permite comprobar si la bacteria presenta movilidad, mediante la turbidez que se observa en el medio en donde se realizó la siembra de la colonia. También se puede comprobar si la bacteria contiene la enzima triptofanasa que rompe el triptófano provocando la síntesis del indol mismo que se evidencia por la formación de un halo rojo en la superficie del medio. La prueba de TSI tiene un color inicial rojo, pero ante la presencia de bacterias fermentadoras de glucosa, sacarosa y lactosa cambian el medio a un color amarillo (Alzate y Delgado. 2020. pp. 2-5)

Tabla 4-4: Bacterias patógenas aisladas del Río Chibunga

<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Salmonella entérica</i> <i>Salmonella paratyphi</i> <i>Shigella flexneri</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Edwardsiella tarda</i>	Bacilos Gram Negativo
<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
<i>Aeromonas</i>	<i>Aeromonas hydrophilas</i>	
<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	Cocos Gram Positivo
<i>Enterococcaceae</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> o <i>Streptococcus faecalis</i>	

Realizado por: Landa, Diana, 2022.

En la tabla 5-4 se enumera las bacterias aisladas de muestras recolectadas del río Chibunga. Las bacterias de importancia clínica son las pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae y otros bacilos Gram negativos como *Pseudomonas aeruginosa* y *Aeromonas hydrophilas*. Las bacterias gram positivas son menos comunes en ambientes acuáticos, pero se han aislado *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis* anteriormente se denominaba *Streptococcus faecalis*,

Todas estas bacterias están asociadas con enfermedades transmitidas por el agua y son indicativo de contaminación fecal. *Pseudomonas* y *Aeromonas* son muy comunes en el medio acuático y se transmiten al consumir agua o alimentos contaminados. Las *Pseudomonas* son capaces de adaptarse al cambio climático ya que requieren de bajas concentraciones de nutrientes (Musto y Iserte. 2013. pp. 45-51).

El agua es un vehículo que implica un riesgo de contagio con microorganismos responsables de gastroenteritis, disentería y dermatitis, principalmente por: *Escherichia coli*, *Pseudomonas* y *S. aureus*. Estos brotes se producen en aguas de recreación un 90% piscinas, balnearios y parques recreativos, un 10% por ríos y playas (Doménech et al. 2007). Para determinar las bacterias causantes de gastroenteritis en los niños, tomaron muestras de agua potable de los bebederos de escuelas públicas, aislaron principalmente *Aeromonas hydrophila* y *Staphylococcus aureus*, en menor cantidad *Pseudomonas stutzeri* y *Enterobacter cloacae*. *Aeromonas* se adaptan a una variedad de ambientes, pero su habitual natural son las aguas dulces que están asociadas con fauna acuática y sedimentos (Martinez et al., 2012).

En el estudio realizado por Caicedo y Marcillo, para determinar la resistencia microbiana en muestras tomadas del regadío del río Chibunga, aislaron e identificaron 18 bacterias de interés clínico en su mayoría pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Vibrio* y *Enterococcus*.

4.2.4. Técnica de fermentación en tubos múltiples

Tabla 5-4: NMP para *Coliformes totales*, *Coliformes fecales* y *E. coli* en el mes de mayo

Muestra	Prueba	Tubos Positivos 10ml	Tubos Positivos 1ml	Tubos Positivos 0.1ml	NMP/100ml	Limite Máximo Permitido
Puente empresa cemento Chimborazo	<i>Coliformes totales</i>	5/5	5/5	3/5	920 NMP	(200 a 1100) Aguas contaminadas
	<i>Coliformes fecales</i>	5/5	5/5	5/5	>1600 NMP	
	<i>Escherichia coli</i>	5/5	5/5	4/5	1600 NMP	
Parque Ecológico	<i>Coliformes totales</i>	5/5	5/5	4/5	1600NMP	
	<i>Coliformes fecales</i>	5/5	5/5	3/5	920 NMP	
	<i>Escherichia coli</i>	5/5	5/5	4/5	1600 NMP	

Puente de la entrada a Chambo	<i>Coliformes totales</i>	5/5	5/5	5/5	>1600 NMP	Aguas muy contaminadas
	<i>Coliformes fecales</i>	5/5	5/5	5/5	>1600 NMP	
	<i>Escherichia coli</i>	5/5	5/5	5/5	1600 NMP	

Realizado por: Landa, Diana, 2022.

Tabla 6-4: NMP para *Coliformes totales*, *Coliformes fecales* y *E. coli* en el mes de agosto

Muestra	Prueba	Tubos Positivos 10ml	Tubos Positivos 1ml	Tubos Positivos 0.1ml	NMP/100ml	Limite Máximo Permitido
Puente empresa cemento Chimborazo	<i>Coliformes totales</i>	5/5	4/5	3/5	280 NMP	(200 a 1100) Aguas contaminadas
	<i>Coliformes fecales</i>	5/5	4/5	4/5	350 NMP	
	<i>Escherichia coli</i>	5/5	5/5	3/5	920 NMP	
Parque Ecológico	<i>Coliformes totales</i>	5/5	5/5	3/5	920 NMP	(>1100) Aguas muy contaminadas
	<i>Coliformes fecales</i>	5/5	5/5	4/5	1600 NMP	
	<i>Escherichia coli</i>	5/5	5/5	4/5	1600 NMP	
Puente de la entrada a Chambo	<i>Coliformes totales</i>	5/5	4/5	4/5	350 NMP	
	<i>Coliformes fecales</i>	5/5	5/5	3/5	920 NMP	
	<i>Escherichia coli</i>	5/5	5/5	5/5	1600 NMP	

Realizado por: Landa, Diana, 2022.

Se muestran los resultados obtenidos de manera cuantitativa del número más probable (NMP) para *Coliformes totales*, *Coliformes fecales* y *Escherichia coli*, en la tabla 5-4 los resultados obtenidos del mes de mayo y en la tabla 6-4 del mes de agosto, de los tres puntos de muestreo del río Chibunga. Tanto para *Coliformes totales*, *Coliformes fecales* y *Escherichia coli* se considera un resultado positivo por la presencia de turbidez y gas dentro de los tubos Durham.

Se compararon los resultados positivos de cada dilución con la tabla de Número más probable por cada 100 ml. En los resultados presentados en el mes de mayo y agosto hay una ligera variación, debido a que en la temporada de lluvia el recuento de *Coliformes fecales*, *Coliformes totales* y *E.coli* fueron más altos ya que la lluvia arrastra más desechos de animales y humanos a los ríos (Him et al., 2018. p.12)

Los resultados obtenidos muestran el río Chibunga representan un riesgo para la salud, esta agua no se puede emplear para ninguna actividad sea esta agrícola, ganadera o recreativa porque supera los límites máximos permisibles. De acuerdo con el Texto Unificado de la Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente de 200 a 1100 NMP/100 son aguas contaminadas y >1100 NMP/100 son aguas muy contaminadas, por los resultados obtenidos se evidencia una alta contaminación de *Escherichia coli*, *coliformes fecales* y *coliformes totales*, siendo indicativo de que las aguas de esta río están contaminadas con heces y otros desechos orgánicos excretados por humanos o animales, puesto que esta bacterias provienen del tracto intestinal y la presencia de estos microorganismos representa una amenaza para la salud. Para el uso de esta agua se requiere de un tratamiento previo para disminuir o eliminar la alta concentración de estas bacterias (TULSMA, 2017, p. 303)

4.3. Antibiogramas

Según el manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión, las enterobacterias presentan resistencia natural a los siguientes antibióticos: penicilina, oxacilina, macrólidos, clindamicina y glicopéptidos. *Klebsiella spp* de manera natural es resistente a las aminopenicilinas y *Proteus mirabilis* es resistente a Nitrofurantoína (Sacsquispe y Velásquez. 2002. p. 32)

Tabla 7-4: Resistencia y sensibilidad de bacterias pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae

Microorganismo	Aminoglucósido		Quinolonas		Betalactámicos					
					Penicilina	Inhibidores de beta-lactamasa	Monobactámicos	Cefalosporina		
								1ra	2da	3ra
AK	GE	CIP	W	AMP	AMC	ATM	CFZ	CXM	CTX	
<i>Escherichia coli</i>	S	S	R	R	R	S	S	R	S	S
<i>Yersinia enterocolitica</i>	S	S	S	R	S	-	-	R	S	S
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	S	R	S	S	R	S	S	R	S	S
<i>Salmonella entérica</i>	-	R	S	R	R	S	S	R	R	S
<i>Salmonella paratyphi</i>	S	S	R	R	R	-	S	S	S	S
<i>Shigella flexneri</i>	R	R	S	S	R	S	S	R	R	S
<i>Proteus mirabilis</i>	S	S	S	R	R	S	S	S	-	-
<i>Edwardsiella tarda</i>	S	S	S	S	R	S	R	-	-	S

Realizado por: Landa, Diana, 2022.

En la tabla 7-4 se muestra los resultados de resistencia y sensibilidad antimicrobiana de las bacterias pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae, en la cual todas presentan sensibilidad a

la amoxicilina + ácido clavulánico y a la cefasporina de tercera generación; cefotaxima. Todas presentan resistencia a la ampicilina.

En la investigación realizada por Molina & Orozco (2019) aislaron bacterias del río Chambo que presentaron resistencia bacteriana: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas spp*, *Enterococcus spp*, *Citrobacter freundii* y *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella oxytoca*. Otro estudio realizado por Nogales & Vela en el mismo año, pero en muestras tomadas del río Guano aislaron e identificaron *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter diversus* todas estas bacterias resistentes a amoxicilina y sensibles a aztreonam.

Los resultados para *Escherichia coli* se de los diez antibióticos utilizados; cuatro no son eficaces, presentan resistencia a; ciprofloxacino, ácido nalidíxico, ampicilina y cefazolina. Por otro lado, los seis antibióticos restantes amikacina, gentamicina, amoxicilina + ácido clavulánico, aztreonam, cefuroxima y cefotaxima muestran un halo de sensibilidad alrededor de los discos que contienen impregnado el antibiótico.

En un estudio realizado en el año 2018 por Ulloa et al. para determinar la resistencia a los antibióticos en bacterias recolectadas en agua de mar cerca de la base antártica mostró que *E. coli* es resistente a diferentes grupos de antibióticos, principalmente a ampicilina, estreptomicina, ácido nalidíxico y cloranfenicol. Aunque todas las cepas presentaron sensibilidad a la amikacina, también se descubrió que algunas cepas eran productoras de BLEE.

La presencia de cepas de *E. coli* resistentes a los antibióticos está estrechamente relacionada con las aguas residuales, ya que en la planta de tratamiento de estas aguas se crea un ambiente propicio para el desarrollo y proliferación de estas bacterias. La propagación de bacterias con resistencia antimicrobiana en el ambiente antártico indica la magnitud en la que se ha extendido la resistencia bacteriana a nivel mundial, siendo un motivo de preocupación puesto que se pueden transferir genes de resistencia a las bacterias que son autónomas de esta región.

Los resultados de resistencia y sensibilidad para *Yersinia enterocolitica*, presentó actividad bacteriana a: amikacina, gentamicina, ciprofloxacina, ampicilina, cefuroxima y cefotaxima, sin embargo, fue resistente a ácido nalidíxico y cefazolina. En un estudio realizado por Novoa et al., 2016. *Yersinia enterocolitica* es muy susceptible a ampicilina, ciprofloxacina y cloranfenicol, presenta resistencia a neomicina y trimetoprim-sulfametoxazol. La producción de enzimas β -lactamasas cromosómicas es el principal mecanismo de resistencia de esta especie bacteriana. Capilla et al., menciona que la resistencia al ácido nalidíxico ha incrementado debido a las adeniltransferasas (ANT) que son enzimas modificantes de aminoglucósidos que inducen

cambios químicos en la estructura del compuesto provocando una unión débil a los ribosomas bacterianos.

Para *Klebsiella pneumoniae* los antibióticos; gentamicina, ceftriaxona, cefazolina y ampicilina presentan resistencia. Mientras que los antibióticos restantes ciprofloxacino, cefotaxima, cefuroxima, amoxicilina+ ácido clavulánico y amikacina si mostraron una actividad bactericida. En un estudio de Kennedy y Estigarribia (2021), al interpretar las pruebas de resistencia y susceptibilidad de las 200 muestras analizadas indicaron que *Klebsiella pneumoniae* presenta una resistencia del 100% a amoxicilina y algunas cefalosporinas ceftriaxona, ceftazidima, cefoxitina y cefazolina. en un 80% a gentamicina, estas manifestaciones se asociaron con la producción de enzimas carbapenemasas y betalactamasas de espectro extendido (BLEE) por parte de esta bacteriana que inhiben el mecanismo de acción farmacológica de las cefalosporinas, penicilinas y carbapenémicos amentando la propagación de la farmacorresistencia de *Klebsiella pneumoniae*.

Los resultados de resistencia y sensibilidad para *Salmonella entérica* son los siguientes; resistente a gentamicina y ácido nalidíxico; sensible a los antibióticos: ciprofloxacino, ampicilina, amoxicilina + ácido clavulánico. A media que pasa el tiempo es evidente el aumento de *Salmonella entérica* multirresistentes a diferentes antibióticos, incluidos los β -lactámicos y las fluoroquinolonas (Calderón al et., 2012. p. 120)

Los resultados de sensibilidad y resistencia de *Salmonella paratyphi*, presentaron los siguientes datos: ciprofloxacino, ácido nalidíxico, ampicilina, tetraciclina y cloranfenicol y fueron sensibles a: amikacina, gentamicina, cefazolina, cefuroxima, cefoxima y norfloxacino. Los resultados obtenidos por en el año 2017 por Zellweger et al. evidencian que *Salmonella* presenta multirresistencia (resistentes a ampicilina, cloranfenicol y sulfametoxazol/trimetoprim) puesto que los tratamientos convencionales no han sido eficaces para tratar las infecciones que provocan esta bacteria, detalla que algunas cepas de esta bacteria son resistentes a cefalosporinas de tercera generación. Esta resistencia se debe a la mutación en los genes de la ADN-gira y la topoisomerasa y la producción de betalactamas que impiden la permeabilidad los antibióticos al interior de bacteria (Miró et al., 2004. p. 2).

Shigella flexneri presentó los siguientes resultados; resistente a amikacina, gentamicina, ampicilina, cefalozina y cefuroxina, presentó actividad antimicrobiana a los siguientes antibióticos: ciprofloxacina, ácido nalidíxico, amoxicilina + ácido clavulánico y cefotaxima. Las cepas aisladas *Shigella* en los últimos años ha presentado un incremento alarmante de resistencia a los antibióticos usados habitualmente en Latinoamérica siendo resistente a cloranfenicol, ampicilina y cotrimoxazol (Merino et al., 2004 p. 5)

Proteus mirabilis presentó sensibilidad a la mayoría de los antibióticos utilizados como son: amikacina, gentamicina, ciprofloxacino, amoxicilina + ácido clavulánico y cefazolina, presentó resistencia a ácido nalidíxico y ampicilina. Un estudio realizado por Chávez en el año 2011 para determinar la frecuencia y susceptibilidad a los antimicrobianos de *Proteus mirabilis* determinó que tiene una alta sensibilidad en un 100% a gentamicina, imipenem, amoxicilina + ácido clavulánico, ceftriaxona y ciprofloxacino y presentó resistencia antibiótica ampicilina.

En los resultados obtenidos para *Edwardsiella tarda* presentó actividad antimicrobiana a los siguientes antibióticos: amikacina, gentamicina, ciprofloxacino, amoxicilina + clavulánico y cefotaxima. También presentó resistencia a ampicilina, aztreoman, clindamicina y eritromicina. En una investigación realizada en el 2001 por Stock & Wiedemann para establecer la susceptibilidad natural de *Edwardsiella*, mediante un procedimiento de microdilución se determinó que todas las especies *Edwardsiella* eran naturalmente sensibles a las tetraciclinas, aminoglucósidos, la mayoría de los betalactámicos, quinolonas, cloranfenicol y la fosfomicina y fueron naturalmente resistentes a macrólidos, lincosamidas, estreptograminas, glicopéptidos, rifampicina, ácido fusídico y oxacilina. *Edwardsiella tarda* era naturalmente resistente a la bencilpenicilina. Según Daza (1998) en su estudio de resistencia bacteriana reportó que la resistencia de *E. tarda* oscila entre el 10-50% a los antibióticos de uso tradicional siendo un caso de resistencia adquirida.

Tabla 83-4: Resistencia y sensibilidad de *Pseudomonas aeruginosa*

Microorganismo	Aminoglucósido		Quinolonas			Betalactámicos			
						Carbapenémicos	Monobactámicos	Cefalosporina	
								3ra	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AK	GE	CIP	OFX	W	IMP	ATM	CAZ	CTX
	S	S	S		R	S	R	S	S

Realizado por: Landa, Diana, 2022.

Según el manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión, *Pseudomonas aeruginosa* tiene una resistencia natural a penicilina, ampicilina, amoxicilina, cefalosporinas de primera y segunda generación, cefotaxima, ceftriaxona, kanamicina, tetraciclina, cloramfenicol y ácido nalidíxico (Sacsquispe y Velásquez. 2002. p. 26).

En la tabla 8-4, se muestran que *Pseudomonas aeruginosa* presenta resistencia a ácido nalidíxico y aztreoman y fue sensible a la amikacina, gentamicina, ciprofloxacina, ofloxacina, imipenem y cefalosporinas de tercera generación; ceftazidima y cefotaxima. Estos resultados concuerdan con un estudio realizado por Correa et al., para determinar la susceptibilidad antimicrobiana de *Pseudomonas aeruginosa* en agua de consumo humano, mostró que la alta proporción de

Pseudomonas en el agua puede estar relacionada con la formación de biopelículas. Las cepas *Pseudomonas aeruginosa* mostró resistencia a al menos uno de los nueve antibióticos analizados, siendo resistente a aztreonam, y tobramicina y sensible a gentamicina, piperacilina/tazobactam, meropenem, imipenem, ceftazidima y amikacina.

En un estudio realizado en el 2017 por Gutiérrez et al., en el agua de uso agrícola determino que *Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria multiresistente ya que no presentan sensibilidad entre 8 a 11 antibióticos. En este estudio *P. aeruginosa* presentó altos niveles de resistencia a ampicilina, ceftriaxona, cloranfenicol, cefalotina, cefotaxima, nitrofurantoína, kanamicina, estreptomina y tetraciclina, se debe a su resistencia intrínseca. También, fueron muy susceptibles a ceftazidima, gentamicina, imipenem, ticarcilina, aztreonam, levofloxacina, netilmicina y carbenicilina.

Por otro lado, Odjadjare et al., han aislado *P. aeruginosa* en muestras tomadas de plantas de tratamiento de agua y han reportado multiresistencias, se encontró que estas bacterias presentaron resistencia de 5 a 11 antibióticos destacando la resistencia a antibióticos pertenecientes al grupo de betalactámicos. En muestras analizadas de agua provenientes de piscinas y jacuzzis indicaba que el 96 % de los aislamientos de *P. aeruginosa* eran multiresistentes (Lutz & Lee. 2011. p. 1). Al presentar una alta resistencia natural a una amplia gama de agentes antimicrobianos y tener una extraordinaria capacidad para adquirir y sintetizar nuevos mecanismos de resistencia, hace de este patógeno oportunista uno de los más difíciles.

Tabla 94-4: Resistencia y sensibilidad de *Aeromonas hydrophila*

Microorganismo	Aminoglucósido		Quinolonas		Betalactámicos					
					Penicilinas		Carbapenémicos	Monobactámicos	Cefalosporina	
					P	AML			IMP	ATM
<i>Aeromonas hydrophila</i>	AK	GE	CIP	W	P	AML	IMP	ATM	CAZ	CTX
	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S

Realizado por: Landa, Diana, 2022.

En la tabla 9-4, se muestran los resultados de resistencia y sensibilidad de *Aeromonas hydrophila*, presenta actividad antimicrobiana a amikacina, gentamicina, ciprofloxacino, ácido nalidíxico, aztreonam, ceftazidima y cefotaxima; y es resistente a penicilina, amoxicilina e imipenem. Estos resultados son similares a los de Itatí et al. (2019) en donde *Aeromonas* a nivel hospitalario se considera una bacteria con importancia clínica, debido a la producción de β -lactamasas presenta resistente natural a algunos antibióticos de uso común (ampicilina, amoxicilina-ácido clavulánico y antibióticos de primera generación), también mostró una susceptibilidad muy alta a cefotaxima,

ceftazidima, amikacina y gentamicina. Se identificaron bacterias aisladas de la familia Aeromonas en muestras recolectadas del río Guamote, donde se observó resistencia a imipenem y amoxicilina (Lara. 2019. p. 22)

Tabla 50-4: Resistencia y sensibilidad para *Staphylococcus aureus*

Microorganismo	Aminoglucósido		Betalactámico			Macrólido	Lincosamida	Glucopéptido	Anfenicol	
			Penicilina	Inhibidores de betalactamasas						
<i>Staphylococcus aureus</i>	AK	GE	P	AML	AMP	E	AZM	DA	VA	C
	S	R	R	R	R	R	R	S	S	R

Realizado por: Landa, Diana, 2022.

Según el manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión, *Staphylococcus aureus* tiene una resistencia natural al ácido nalidíxico, ácido pipemídico y aztreonam (Sacsquispe y Velásquez. 2002. p. 32).

En la tabla 10-4, *Staphylococcus aureus* es resistente a la mayoría de los antibióticos como son gentamicina, penicilina, amoxicilina, ampicilina, eritromicina, azitromicina y cloranfenicol. Presenta sensibilidad antimicrobiana a 3 de los antibióticos utilizados; amikacina, clindamicina y vancomicina. Se evidencio una corresponsencia de eritromicina y azitromicina. *Staphylococcus aureus* es una bacteria que se encuentra distribuida ampliamente en la naturaleza, presenta una elevada resistencia.

En ambientes hospitalarios existe una alta prevalencia. Los resultados obtenidos son semejantes con los de Pasachova et al, 2021 que menciona que *S. aureus* es altamente resistente a la penicilina, meticilina, ciertos antibióticos pertenecientes al grupo de los betalactámicos, macrólidos, lincosamidas, trimetropim y sulfonamidas. Esta resistencia se debe a que presenta en su DNA secuencias de inserción, que son segmentos de DNA que puede moverse en una posición cromosómica a otra del mismo o diferente cromosoma y la formación de biopelículas que contribuye a la persistencia bacteriana.

Zendejas et al., 2014 indica que existen reportes de resistencia por la adquisición de plásmidos contra los siguientes antibióticos; vancomicina, tetraciclina, eritromicina, ampicilina, ceftazidima, penicilina, gentamicina y ampicilina, siendo cada vez más alarmante, puesto que estos antibióticos presentaban resultados más eficaces que la penicilina en el tratamiento para las infecciones provocadas por *Staphylococcus aureus*.

Tabla 6-4: Resistencia y sensibilidad para *Enterococcus faecalis*

Microorganismo	Aminoglucósido	Betalactámico		Lincosamida	Quinolonas	Glucopéptido	Tetraciclina
		Penicilina					
<i>Enterococcus faecalis</i>	GE	P	AMP	DA	CIP	VA	TE
	R	R	S	R	S	R	S

Realizado por: Landa, Diana, 2022.

Según el manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión, *Enterococcus faecalis* tiene una resistencia natural al a oxacilina, cefalosporinas y Cotrimoxazol (Sacsquispe y Velásquez. 2002. p. 24).

En la tabla 11-4 se detalla la resistencia y sensibilidad antimicrobiana de *Enterococcus faecalis*, han desarrollado resistente adquirida a gentamicina, penicilina, vancomicina y clindamicina. Presenta sensibilidad a ampicilina, ciprofloxacina y tetraciclina. La presencia de esta bacteria en agua indica contaminación fecal. En la investigación realizada por Pucciarelli et al. (2014) en muestras provenientes de agua de arroyo, determino que *E. faecalis* es altamente resistente a antibióticos aminoglucósidos principalmente gentamicina y una resistencia intermedia a vancomicina, pero es ampliamente sensible a la ampicilina.

Estos resultados son semejantes a los obtenidos por Baldini & Selzer (2008), los Enterococos aislados no presentan resistencia a vancomicina, ampicilina y teicoplanina. *E. faecalis* presente resistencia intermedia a gentamicina y ciprofloxacino. Al comparar ambos estudios se demuestra que con el pasar de los años esta bacteria ha generado mecanismo de resistencia refiriéndose a la vancomicina.

Estudios recientes indican que más del 90 % de las cepas bacterianas marinas son resistentes a más de un antibiótico, y 20 % son resistentes al menos a cinco. Las bacterias multirresistentes se han propagado en la mayoría de los ambientes acuáticos, constituyendo una amenaza mundial para la salud humana. Se han estudiado muestras de agua provenientes de diferentes ríos de la provincia de Chimborazo (Chibunga, Guano, Chanchán y Guamote), se han aislado e identificado bacterias potencialmente patógenas que han desarrollado mecanismo de resistencia a más de tres antibióticos, en los medios acuáticos en condiciones óptimas de temperatura y pH tienden a desarrollarse y expandirse al suelo y productos agrícolas que se encuentran cultivos en las zonas aledañas a los ríos. Estas bacterias son indicativas de contaminación fecal puesto que la mayoría de ellas son comensales a nivel intestinal de personas y animales.

CONCLUSIONES

- En las muestras tomadas del río Chibunga, se aislaron e identificaron 12 bacterias de importancia clínica que resultan nocivas para la salud de la población en especial para quienes realizan actividades sean agrícolas o ganaderas cercanas a las riberas del río, mediante el uso de agares selectivos como; Baird Parker (*Staphylococcus*), MacConkey (*Klebsiella* y *Proteus*), Hektoen (*Salmonella* y *Escherichia*), agar SS (*Shigella* y *Salmonella*) y el agar Sangre que fue utilizado principalmente para el aislamiento bacteriano hasta obtener un cultivo puro mismo que se confirma con la tinción de gram.
- Se caracterizaron las bacterias mediante el uso de pruebas bioquímicas determinando así bacilos gran (-) pertenecientes a la familia Enterobacteriácea; *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella entérica*, *Salmonella paratyphi*, *Shigella flexnery*, *Proteus mirabilis* y *Edwardsiella tarda*. También, *Pseudomonas aeruginosa* y *Aeromonas hydrophila*; y cocos gram (+): *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*.
- Se realizaron los antibiogramas por duplicado, donde se determinó la resistencia y susceptibilidad antimicrobiana descartando la resistencia natural que poseen las bacterias; donde la mayoría presentaba resistencia a tres o más antibióticos siendo los más comunes: ampicilina, ácido nalidixico y cefalozina, Por otro lado, presentaron sensibilidad a amikacina, amoxicilina + ácido clavulánico, aztreonam y cefotaxima
- Debido a los resultados obtenidos en las pruebas de inhibición bacteriana todas las especies bacterianas identificadas presentan resistencia natural a ampicilina a excepción de *Yersinia enterocolitica* esta bacteria presenta resistente a ácido nalidixico y cefazolina, *Proteus mirabilis* resistente a ácido nalidixico, *Edwardsiella tarda* resistente a aztreonam, *Salmonella paratyphi* resistente a: ciprofloxacino y ácido nalidixico, *Aeromonas hydrophila* presenta resistencia a los antibióticos betalactámicos: penicilina e imipenem. La mayoría son multirresistentes puesto que son resistencia a tres o más clases de antibióticos, todos presentan resistencia a los betalactámicos (cefalosporinas de 1ra generación; cefazolina y 2da generación; cefuroxima y penicilinas), aminoglucósidos (gentamicina) y quinolonas (ácido nalidixico): *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella entérica*, *Shigella flexnery* y *Pseudomonas aeruginosa* bacteria que presenta resistencia adquirida.
- *Staphylococcus aureus* a más de ser resistente a los grupos de antibióticos mencionados, también presenta resistencia a los macrólidos (eritromicina y azitromicina), anfenicoles (cloranfenicol) e inhibidores de las betalactamasas (amoxicilina, ampicilina) y *Enterococcus*

faecalis presenta resistencia a los aminoglucósidos (gentamicina), penicilina, lincosamidas (clindamicina) y glucopeptidos (vancomicina)

- Se identificó la presencia de coliformes totales, coliformes fecales y *Escherichia coli* estos parámetros son importantes para determinar la sanidad del agua. El río Chibunga sobrepasa los límites permisibles en las diferentes normas en especial TULSMA, por lo cual esta agua no es apropiada para el consumo.

RECOMENDACIONES

- Dentro del laboratorio se deben tener normas de asepsia y esterilidad para evitar posibles interacciones con bacterias u hongos que se encuentran en el ambiente, también todos los medios de cultivo deben estar en condiciones óptimas.
- Para las pruebas de inhibición bacteriana se debe tener identificado correctamente a las bacterias y antes de colocar los discos de antibiograma se debe realizar una búsqueda bibliográfica sobre los antibióticos a los cuáles son resistentes por naturaleza.
- Para las futuras investigaciones se recomienda realizar este estudio en temporada de verano, puesto que en invierno el agua del río está más diluida y hay menor concentración bacteriana.
- Se debería realizar un control anual del río Chibunga con respecto a los parámetros microbiológicos, así como también físicos y químicos, ya que este río es considerado como uno de los más contaminados dentro del país, tomando en cuenta que en ciertas zonas esta agua es usada en agricultura y ganadería

BIBLIOGRAFÍA

AEMPS. *Plan estratégico y de acción para reducir el riesgo de selección y diseminación de resistencias a los antibióticos.* SYNASC [en línea] 2018, pp. 323–330. Disponible en: <https://doi.org/10.1109/SYNASC.2011.44>

ALIAGA, M. *Morfología y estructura de las bacterias.* [en línea] 2011. Disponible en: <https://medicinaupv.files.wordpress.com/2011/04/2-3-clase-morfologc3ada-y-estructura-de-laa-bacterias.pdf>

ALÓS, J. *Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global.* *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, [en línea] 2015, pp. 692–699. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.10.004>

ÁLVAREZ, E. *Calidad microbiológica del agua del río Mero.* 2017.

ÁLVAREZ, M. *Manual de técnicas en microbiología clínica.* [en línea] 1988. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/libro?codigo=193702>

APELLA, M. y ARAUJO, P. *Microbiología del agua. Conceptos básicos. Tecnologías solares para la desinfección y descontaminación del agua* [en línea], 2005, pp. 33-50.. Disponible en: https://www.psa.es/es/projects/solarsafewater/documents/libro/02_Capitulo_02.pdf

ARREDONDO, J et al. *Susceptibilidad antimicrobiana de Enterococcus faecalis y faecium en un hospital de tercer nivel.* [en línea]. 2018. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/infectologia/lip-2018/lip182d.pdf>

ARYAL, S. *MacConkey Agar-Composition, Principle, Uses, Preparation and Colony Morphology* [en línea]. 2015. Disponible en: <https://microbiologyinfo.com/macconkey-agar-composition-principle-uses-preparation-and-colony-morphology/>

ATIAJA, D. *Resistencia antimicrobiana de bacterias patógenas presentes en el agua del río Chanchán.* [en línea]. 2015. Disponible en: <http://dspace.unach.edu.ec/bitstream/51000/6224/1/Resistencia%20antimicrobiana%20de%20bacterias%20pat%20c3%b3genas%20presentes%20en%20el%20agua%20del%20r%20c3%ado%20Chanch%20c3%a1n.%202019.pdf>

BAGUA, J. *Evaluación de la contaminación por Staphylococcus aureus en puntos de toma de agua potable en parques de Quito.* [en línea], 2021. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/24721/1/UCE-FCQ-CQA-BAGUA%20JOMYRA.pdf>

BAQUE, R et al. *Calidad del agua destinada al consumo humano en un cantón de Ecuador* [en línea], 2016. Disponible en: <https://ojs.unemi.edu.ec/index.php/cienciaunemi/article/view/357>

BAQUERIZO, M. *Contaminación de los ríos: caso río Guayas y sus afluentes.* [en línea], 2019. Disponible en: <https://erp.untumbes.edu.pe/revistas/index.php/manglar/article/view/118/241>

BARRERO, L. *Microbiología Clínica* [en línea]. España- Madrid: Síntesis, 2016. Disponible en: <https://www.sintesis.com/data/indices/9788490773185.pdf>

BENAVIDES, J et al. *Aislamiento e identificación de diez cepas bacterianas desnitrificantes a partir de un suelo agrícola contaminado con abonos nitrogenados proveniente de una finca productora de cebolla en la Laguna de Tota, Boyacá, Colombia.* 2006.

BES, S et al. *Manual técnico sobre procesos de oxidación avanzada aplicados al tratamiento de aguas residuales industriales.* CYTED [en línea], 2018, pp. 34-37. Disponible en: http://www.cyted.org/sites/default/files/manual_sobre_oxidaciones_avanzadas_0.pdf

BIOCEN. *Manual de medios de cultivo.* [en línea], 2018. Disponible en: <https://www.biocen.cu/wp-content/uploads/2021/05/Manual-MC-2018.pdf>

BONILLA, M. *Manual de prácticas de microbiología básica.* Universidad Autónoma Metropolitana Cuajimalpa. 2016.

BURGUET, N. y CASTILLO, A. *Control de calidad de los medios de cultivo utilizados en el monitoreo ambiental de las áreas clasificadas de producción.* *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología* [en línea]. 2013, pp. 155-160. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-30032013000200004

CAICEDO, L. y MARCILLO, K. *Resistencia antimicrobiana en bacterias patógenas aisladas del regadío del río Chibunga.* [en línea] 2018. Disponible en: <http://dspace.uazuay.edu.ec/bitstream/datos/7646/1/06678.pdf>

CALISTO, N et al. *Antibiotic resistance in bacteria from seawater surrounding antarctic stations.* *Anales Instituto Patagonia*, 2018, pp. 29–39.

CAMACHO, A., y VOLFREDO, J. *Los antimicrobianos en la práctica médica.* In *Medicina Intensiva*. 2010.

CAMARÓ, M et al. *Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos.* [en línea] 2013. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia48.pdf>

CAMPAÑA, A et al. *Evaluación físico-química y microbiológica de la calidad del agua de los ríos Machángara y Monjas de la red hídrica del distrito metropolitano de Quito.* *Bionatura*, [en línea] 2017. pp. 305–310. Disponible en: <https://doi.org/10.21931/rb/2017.02.02.6>

CAMPUZANO, S et al. *Determinación de la calidad microbiológica y sanitaria de alimentos preparados vendidos en la vía pública de la ciudad de Bogotá D.C.* *NOVA*, 2015, pp. 81–92.

CAPILLA, S et al. *Estudio epidemiológico de la diseminación de cepas clínicas de Yersinia enterocolítica.* [en línea] 2008. Disponible en: <https://seq.es/wp-content/uploads/2008/08/235.pdf>

CERCENADO, E. *El antibiograma.* *Ecografía En Diagnóstico Prenatal* [en línea] 2018, pp. 169–172. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/b978-84-458-1845-9.50012-8>

CHELA, B. *El turbio recorrido del río Chibunga.* [en línea] 2020, pp. 2–3. Disponible en: <https://www.servindi.org/actualidad-cronica-noticias-radioteca-audios/09/03/2020/de-las-aguas-cristalinas-del-chimborazo>

CIP. *Revisión y actualización de la norma de calidad ambiental y descarga de efluentes.* [en línea] 2018. Disponible en: <https://www.cip.org.ec/attachments/article/1579/PROPUESTA%20ANEXO%201.pdf>

CMAS. *Descripción del proceso del tratamiento de aguas residuales en las plantas de tratamiento i y ii.* [en línea] 2018, pp. 169–172. Disponible en: <https://cmasxalapa.gob.mx/gom/wp-content/uploads/2018/11/DESCRIPCION-DEL-PROCESO-DEL-TRATAMIENTO-DE-AGUAS-RESIDUALES..pdf>

CONA, T. *Condiciones para un buen estudio de susceptibilidad mediante test de difusión en agar.* *Rev. chil. infectol.* [en línea] 2002. Disponible en: <http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S071610182002019200001&lng=es&nrm=iso>.

CORREA, A. et al. *Susceptibilidad a antibióticos de Pseudomonas aeruginosa aislada de agua de consumo humano de la comunidad Santa Rosa de Agua, Maracaibo, estado Zulia.* [en línea] 2015. Disponible en: https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562015000200005

DAZA, R. *Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria.* [en línea] 1998. Disponible en: <https://www.sanidad.gob.es/biblioPublic/publicaciones/docs/bacterias.pdf>

DELGADO, E. *Series de identificación bioquímica.* [en línea] 2021. Disponible en: <https://mdmcientifica.com/wp-content/uploads/2021/03/IS-24-SERIES-DEIDENTIFICACION-BIOQUIMICA.pdf>

DOMÉNECH, A. *Infecciones relacionadas con las aguas de recreo.* [en línea] 2007. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/ccs-2007-bacteriologia2.pdf>

FERNÁNDEZ, F et al. *Resistencia bacteriana. Revista Brasileira de Medicina,* [en línea] 2020, pp. 1129–1140. Disponible en: <https://doi.org/10.20453/rmh.v9i2.2384>

FORBES, B. et al. *Diagnóstico Microbiológico de Bailey & Scott. 12 ed. Argentina. Editorial Panamericana S.A.* 2009.

GARCÉS DE GRANADA, E. *Morfología y clasificación de los hongos.* [en línea] 2003. Disponible en: <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/79887/Morfolog%20y%20clasificaci%20de%20los%20hongos.pdf?sequence=2&isAllowed=y>

GARCÍA, C. *Técnicas y métodos de estriado en caja y tubo.* [en línea] 2019. Disponible en: <http://microbiologia3bequipo5.blogspot.com/2014/10/tecnicas-y-metodos-de-estriado-en-caja.html>

GIL, M. *Agar nutritivo: fundamento, preparación y usos.* [en línea] 2019. Disponible en: <https://www.lifeder.com/agar-nutriente/>

GÓMEZ, A et al. *La caldiad sanitaria del agua de consumo.* [en línea] 2016. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0213911116300589>

GONZÁLEZ, M et al. *Caracterización fenotípica de cepas de Escherichia coli uropatógena.* [en línea] 2013. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rfnsp/v35n2/0120-386X-rfnsp-35-02-00236.pdf>

HERNÁEZ, S. y LEIVA, J. *Bacterias multirresistentes. Gastroenterología y Hepatología Continuada,* [en línea] 2015, pp. 191–195. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/s1578-1550\(05\)75141-x](https://doi.org/10.1016/s1578-1550(05)75141-x)

HIM, F et al. *Calidad Fisico-Química Y Microbiológica Del Agua Del Río Santa María En Las Inmediaciones Del Reservorio De Agua Del Acueducto De Santiago, Veraguas. Tecnociencia,* [en línea] 2019, pp. 13–30. Disponible en: <http://portal.amelica.org/ameli/jatsRepo/224/224979002/index.html%0AEsta>

HIRIS. *Informe sobre resistencia antimicrobiana.* [en línea] 2021. Disponible en: <https://seq.es/wp-content/uploads/2021/10/Informe-RAM-2021.pdf>

ITATI, M. *Bacteriemias por Aeromona spp. en pacientes adultos que acuden al Hospital Universitario.* [en línea] 2018. Disponible en: <https://revistas.unc.edu.ar/index.php/med/article/view/23821/24552#:~:text=Aeromonas%20es%20considerado%20un%20pat%C3%B3geno,%2C11%2C13%2D14>

KENNETHJ. R. Sherris. *Microbiología médica 6e. México* [en línea] 2017. Disponible en: <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=2169§ionid=162978716>

KONEMAN, E et al. *Diagnóstico Microbiológico. (5ta ed.). Argentina, Editorial Panamericana S.A. 2004.*

LANDER, R. *El proceso de tratamiento de aguas residuales y eliminación de contaminantes emergentes.* [en línea] 2018. Disponible en: <https://www.iagua.es/blogs/lander-rodriguez-jorge/proceso-tratamiento-aguas-residuales-y-eliminacion-contaminantes>

LARREA, J. *Bacterias indicadoras de contaminación fecal en la evaluación de la calidad de las*

aguas: revisión de la literatura. [en línea] 2013. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/1812/181229302004.pdf>

LOPARDO, H. *Introducción a la microbiología clínica.* Universidad de La Plata, 2018.

LÓPEZ, L. *Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología.* [en línea] 2013. Disponible en: https://www.medigraphic.com/pdfs/invd/ir-2014/ir141b.pdf?fbclid=IwAR3z9_ljzoGBF2taww_xeAuX2t1CkN

LUNA, J. *Manual de prácticas de laboratorio.* 2012.

LUTZ, J. *Prevalence and antimicrobial-resistance of Pseudomonas aeruginosa in swimming pools and hot tubs.* [en línea] 2017. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21556203/>

MALBRÁN, C. *Resistencia a los antimicrobianos : causas , consecuencias y perspectivas en Argentina.* Whonet-Argentina, [en línea] 2017. Disponible en: <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2015/06/Article1.pdf>

MARÍN, R. *Fisicoquímica y microbiología de los medios acuáticos: tratamiento y control de calidad de aguas.* Ediciones Díaz de Santos. [en línea] 2003. Disponible en: <https://elibro.net/es/lc/epoch/titulos/53050>

MARÍN, R. *Microbiología de las aguas* [en línea] 2017. Madrid: Ediciones Díaz de Santos. Disponible en: <https://elibro.net/es/ereader/epoch/62909>

MARTINEZ, G et al. *Aislamiento, identificación y tipificación de levaduras en pacientes VIH positivos con candidiasis oral.* *Rev Cubana Med Trop* [en línea]. 1997. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S037507601997000300004&lng=es&nr m=iso.

MERINO, L. et al. *Resistencia a antibióticos y epidemiología molecular de Shigella spp. en el nordeste argentino.* [en línea] 2004. Disponible en: <https://scielosp.org/article/rpsp/2004.v15n4/219-224/es/>

MINISTERIO DEL AMBIENTE. *TULSMA.* [en línea] 2003. Disponible en: <https://www.ambiente.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2018/05/TULSMA.pdf>

MIRÓ, E. et al. *Resistencia a quinolonas y betalactámicos en Salmonella enterica, y su relación con mutaciones en las topoisomerasas, alteraciones en la permeabilidad celular y expresión de un mecanismo de expulsión activa.* [en línea] 2004. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-resistencia-quinolonas-betalactamicos-salmonella-enterica-13059049>

MOLINA, L. *Propuesta para el uso de agua subterránea del distrito de Uraca-Corire* [en línea] 2018. Disponible en: <https://repositorio.unsa.edu.pe/bitstream/handle/UNSA/5750/QUmoguly.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

MORA, D. *Evolución de las guías microbiológicas de la OMS para evaluar la calidad del agua para consumo humano:1984 -2004.* [en línea] 2017. Disponible en: https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-14292005000200007

MORENO, M. *Estudio de la microflora bacteriana (Vibrionaceae) presente en las fases iniciales de vida de la cabrilla arenera.* 2004.

MSP. *Reporte de datos de resistencia a los antimicrobianos en Ecuador. Ministerio de Salud Publica,* [en línea] 2018. Disponible en: https://www.salud.gov.ec/wp-content/uploads/2019/08/gaceta_ram2018.pdf

MUSTO, A. *Manual de microbiología y parasitología.* 2013.

NOVOA, O et al. *Susceptibilidad de las bacterias aisladas de infecciones gastrointestinales agudas a la rifaximina y otros agentes antimicrobianos en México.* [en línea] 2016. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0375090615000798>

NUÑEZ, L et al. *Bacterias resistentes a antibióticos en aguas grises como agentes de riesgo sanitario. Revista Ambiente e Agua,* [en línea] 2016, pp. 445–458. Disponible en: <https://doi.org/10.4136/1980-993X>

NTE INEN. *Control microbiológico de los alimentos. Detección y recuento de Escherichia coli presuntiva por la técnica del número más probable* [en línea]. 2016. Disponible en: https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte_inen_1529-8-1.pdf.

ODJADJARE, E. *Prevalence of Multiple Antibiotics Resistant (MAR) Pseudomonas Species in the Final Effluents of Three Municipal Wastewater Treatment Facilities in South Africa.* [en línea] 2017. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3397366/>

OMS. *Plan de acción mundial sobre la resistencia de los antimicrobianos.* [en línea], 2020. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/255204/9789243509761-spa.pdf>

OPS. *Peligros biológicos.* [en línea], 2020. Disponible en: https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10838:2015-peligros-biologicos&Itemid=0&lang=es#gsc.tab=0

OSORES. *Presencia de bacterias patógenas en las aguas de la desembocadura del Río Surco y la Playa La Chira, Lima, Perú.* [en línea] 2009. Disponible en: https://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/acta_medica/2009_n4/pdf/a10v26n4.pdf

PALACIOS, C. *Distribución de coliformes fecales en el área marina de la costa ecuatoriana en las provincias de Esmeraldas y Manabí, 2008-2013.* [en línea], 2018. Disponible en: https://www.inocar.mil.ec/web/phocadownloadpap/actasoceanograficas/acta18/OCE1801_6.pdf

PASACHOVA, J et al. *Staphylococcus aureus: generalidades, mecanismos de patogenicidad y colonización celular'. Nova* [en línea], 2019, pp. 25-38.. Disponible en: <https://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/nova/article/view/3631>

PEREZ, H., y ROBLES, A. *Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana. Revista Médica MD,* 2016.

PLÚAS, A et al. *Determinación de Coliformes Totales y Escherichia Coli en el Estuario Chulluype del Cantón Santa Elena Provincia de Santa Elena.* [en línea], 2019. Disponible en: <https://revistas.uees.edu.ec/index.php/IRR/article/view/400/435#:~:text=De%20acuerdo%20con%20el%20Texto,del%20filo%20costero%20en%20el>

POMPOSO, R. *Programas de práctica de microbiología y micología.* [en línea] 2013. Disponible en: http://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/58421/56_ARCH0_PRACTICAS%20DE%20BACTERIOLOGIA.pdf?sequence=1&isAllowed=y

PUIG. Y et al. *Resistencia antimicrobiana en bacterias aisladas en pescados y mariscos.* [en

línea] 2019. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-519X2019000300500#B2

QUENTA, A. *Tipos de siembra.* [en línea], 2020. Disponible en: <https://www.studocu.com/pe/document/universidad-privada-de-tacna/microbiologia/tipos-de-siembra-microbiologia/9019969>

QUIZHPE, A. *Uso apropiado de antibióticos y resistencia bacteriana.* 2014.

RAMIREZ, J. *Manual de laboratorio de microbiología.* 2018.

REYNOSO, M. *Manual de microbiología general.* 2018.

RÍOS, S et al. *Patógenos e indicadores microbiológicos de calidad del agua para consumo humano.* [en línea] 2017. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rfnsp/v35n2/0120-386X-rfnsp-35-02-00236.pdf>

RIVERA, L, et al. *Resistencia de la Salmonella a los antimicrobianos convencionales para su tratamiento.* [en línea] 2016. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/3214/321428107010.pdf>

ROCHA, C et al. *Emerging antibiotic resistance: A global threat and critical healthcare problem. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica* [en línea] 2016, pp. 139–145. Disponible en: <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2015.321.1586>

ROMEU, B et al. *Calidad microbiológica de las aguas del río Luyanó, La Habana, Cuba. Revista CENIC : Ciencias Biológicas,* 2014.

ROY, C. *Resistencia Bacteriana a Los Antibioticos Betalactamicos. Medicina Clinica,* 2015, pp. 299–301.

SACSAQUISPE, R. *Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad microbiana por el método de disco en difusión.* 2002.

SÁNCHEZ, H et al. *Calidad bacteriológica del agua para consumo humano en zonas de alta marginación de Chiapas. (Spanish). Salud Pública de México,* 2015.

SÁNCHEZ, R y GARCÍA, K. *Tratamiento de aguas residuales de cargas industriales con oxidación avanzada en sistemas convencionales'*. *Revista de Ciencias de la Vida* [en línea], 2018, 27(1), pp. 103-111. Disponible en: http://scielo.senescyt.gob.ec/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1390-85962018000100103

SANTAMBROSIO, E. *Siembra y recuento de microorganismos*. [en línea] 2009. Disponible en: https://www.frro.utn.edu.ar/repositorio/catedras/quimica/5_anio/biotecnologia/practico.pdf

SANZ, S. *Prácticas de microbiología*. 2011, p.9.

STOCK, I. *Natural Antibiotic Susceptibilities of *Edwardsiella tarda*, *E. ictaluri*, and *E. hoshinae**. 2001. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC90638/>

UMARAN, A et al. *Patogenia bacteriana. Tecnicas Moleculares Para La Deteccion Y Control De Bacterias Patogenas*. 2017.

UNINET. *Calidad del agua. Determinación del NMP de coliformes totales, coliformes fecales y *E. coli* presuntiva*. [en línea] 1987. Disponible en: <http://legismex.mty.itesm.mx/normas/aa/aa042.pdf>

VARGAS, T y Kuno, A. *Morfología bacteriana*. [en línea], 2014. Disponible en: http://metabase.uaem.mx/bitstream/handle/123456789/1466/280_2.pdf?sequence=1

VAZ DE MELLO, R. *Agar Sangre* [en línea] 2013. Disponible en: <https://es.renylab.ind.br/wp-content/uploads/2018/05/Agar-Sangre.pdf>

ZELLWEGER, R. et al. *A 23-year retrospective investigation of *Salmonella Typhi* and *Salmonella Paratyphi* isolated in a tertiary Kathmandu hospital"*. *Sangre* [en línea] 2018. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0006051>

ZENDEJAS, G. *Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación*. [en línea] 2018. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/revbio/bio-2014/bio143d.pdf>



ANEXOS

ANEXOS A: TOMA DE MUESTRA

Sector de la empresa Cemento Chimborazo	Parque Ecológico	Puente da la entrada a Chambo
		

ANEXO B: MUESTRAS ROTULADAS



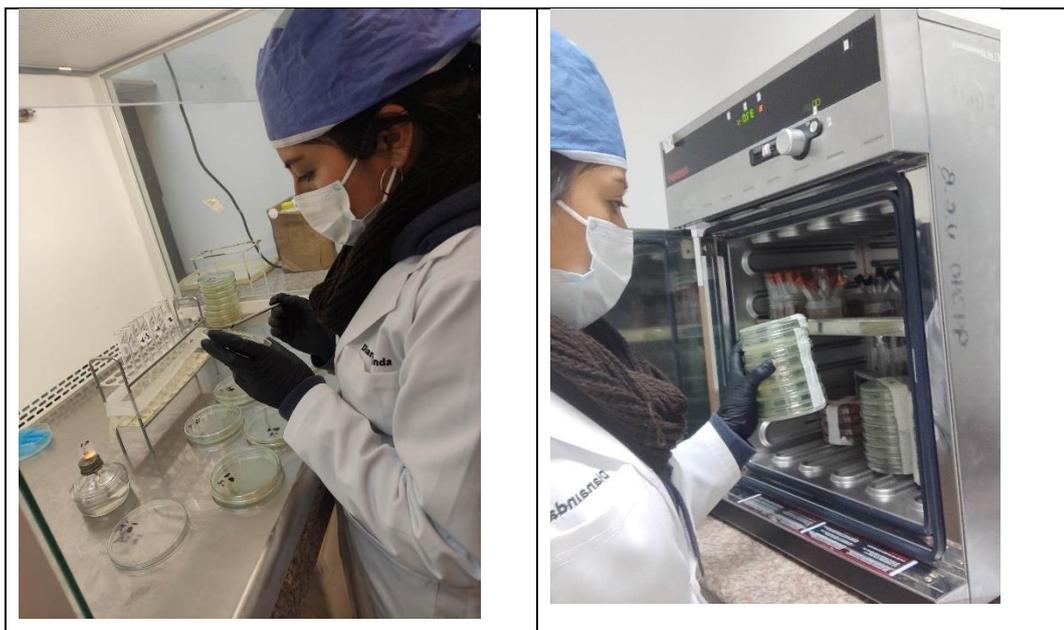
ANEXO C: DILUCIONES



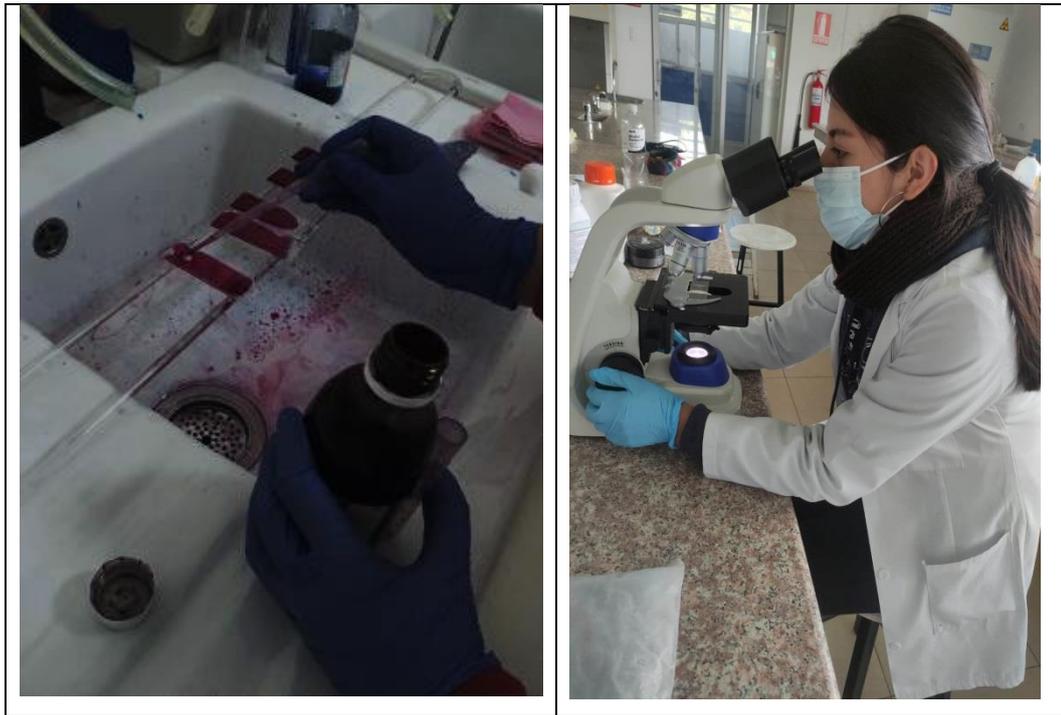
ANEXO D: PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO



ANEXO E: SIEMBRA E INCUBACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO



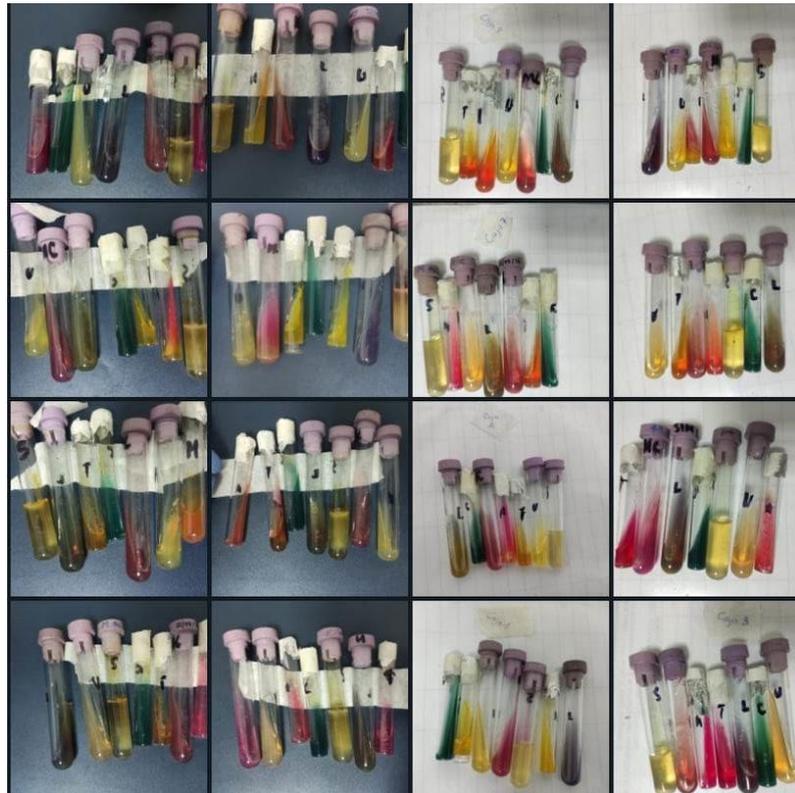
ANEXO F: TINCIÓN DE GRAM OBSERVACIÓN EN EL MICROSCOPIO



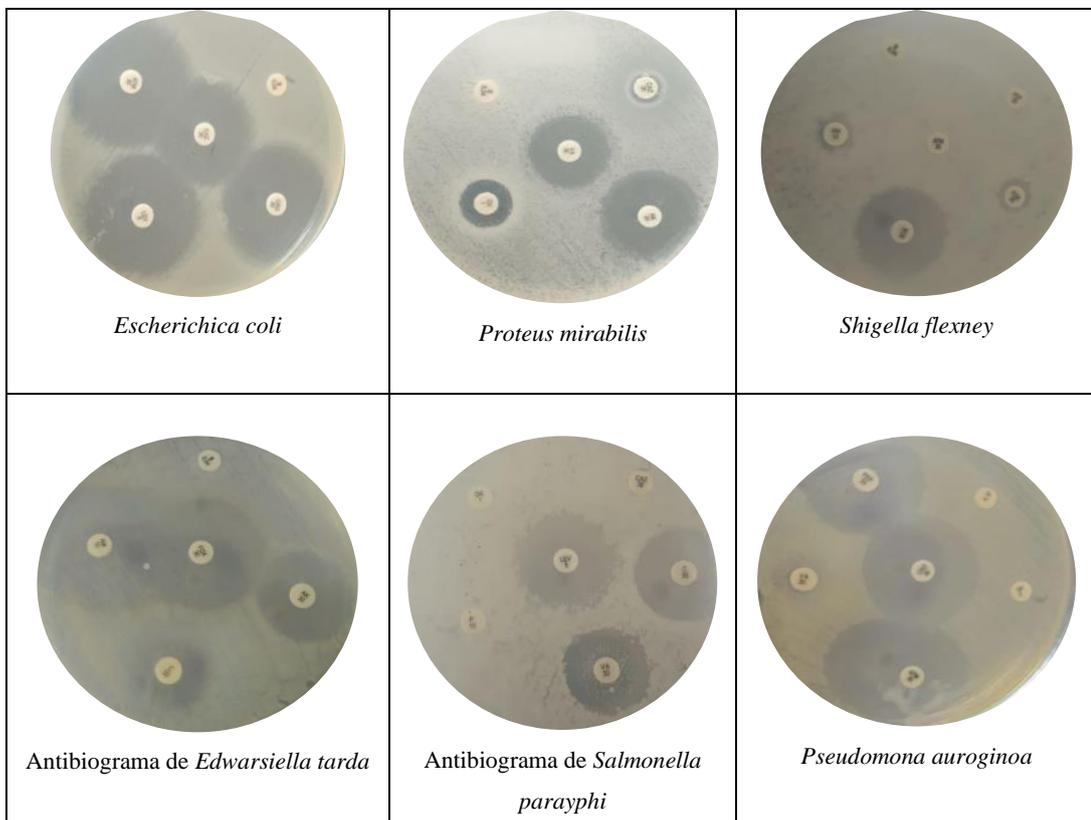
ANEXO G: OBTENCION DE CULTIVOS PUROS



ANEXO H: RESULTADO DE PRUEBAS BIOQUÍMICAS



ANEXO I: ANTIBIOGRAMAS



ANEXO J: TÉCNICA DE NMP

Confirmación de presencia de CT



Confirmación de presencia de CF





epoch

Dirección de Bibliotecas y
Recursos del Aprendizaje

UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y
DOCUMENTAL

REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA

Fecha de entrega: 31 / 01 / 2024

INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)
Nombres – Apellidos: Diana Marisol Landa Sailema
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL
Facultad: Ciencias
Carrera: Bioquímica y Farmacia
Título a optar: Bioquímica Farmacéutica
f. Analista de Biblioteca responsable: Ing. Rafael Inty Salto Hidalgo



1094-DBRA-UPT-2023