



# **UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLÍVAR**

**Facultad de ciencias agropecuarias recursos naturales y del ambiente**

**Carrera de Agroindustrias**

**Tema:**

**EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DEL AGUA EMBOTELLADA EN LA PROVINCIA BOLÍVAR A TRAVÉS DE ANÁLISIS BIOMOLECULARES (PCR) Y CULTIVOS MICROBIOLÓGICOS.**

**Proyecto de investigación previo a la obtención del título de ingeniero Agroindustrial, otorgado por la Universidad Estatal De Bolívar, a través de la Facultad de Ciencias Agropecuarias Recursos Naturales y del Ambiente, Carrera de Agroindustrias**

**Autor:**

Llanos García Francisco Andrés.

**Tutor:**

Ing. Darwin Alberto Núñez Torres Mg.

**Guaranda – Ecuador**

**2024**

**“EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DEL AGUA EMBOTELLADA EN LA PROVINCIA  
BOLÍVAR A TRAVÉS DE ANÁLISIS BIOMOLECULARES (PCR) Y CULTIVOS  
MICROBIOLÓGICOS”**

**REVISADO Y APROBADO POR:**



---

**Ing. Darwin Núñez Mg**

**TUTOR**



---

**Dr. Favian Bayas PhD**

**PAR LECTOR**



---

**Dr. Carlos Jacome PhD**

**PAR LECTOR**



### CERTIFICACIÓN DE AUTORÍA

Yo, Francisco Andrés llanos García con CI 020240104-8 declaro que el trabajo y los resultados presentados en este informe no han sido presentados previamente para ningún grado o calificación profesional; y que las referencias bibliográficas que se incluyen han sido consultadas y citadas con sus respectivos autores(es).

La Universidad Estatal De Bolívar puede hacer usos de los derechos de publicación correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, su Reglamentación y la Normativa Institucional Vigente.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Andrés", written over a horizontal line.

**Francisco Llanos**  
C.I.0202401048

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Darwin", written over a horizontal line.

**Ing. Darwin Núñez Mg**  
C.I.0201977576



*Notaria Tercera del Cantón Guaranda*  
*Msc. Ab. Henry Rojas Narvaez*  
*Notario*



rio...

N° ESCRITURA: 20220201003P02909

DECLARACION JURAMENTADA

OTORGADA POR: LLANOS GARCIA FRANCISCO ANDRES

INDETERMINADA DI: 2 COPIAS H.R. Factura: 001-006-000005206

En la ciudad de Guaranda, capital de la provincia Bolívar, República del Ecuador, hoy día diecinueve de Diciembre del dos mil veintitrés, ante mi Abogado HENRY ROJAS NARVAEZ, Notario Público Tercero del Cantón Guaranda, comparece el señor LLANOS GARCIA FRANCISCO ANDRES, soltero de ocupación estudiante, domiciliada en el Cantón San Miguel, Provincia Bolívar, celular 0989790373, correo electrónico es andresllanosg@gmail.com, por sus propios y personales derechos, obligarse a quien de conocerle doy fe en virtud de haberme exhibido sus documentos de identificación y con su autorización se ha procedido a verificar la información en el Sistema Nacional de Identificación Ciudadana; bien instruidas por mí el Notario con el objeto y resultado de esta escritura pública a la que procede libre y voluntariamente, advertidas de la gravedad del juramento y las penas de perjurio, me presenta su declaración Bajo Juramento declaran lo siguiente manifestó que el criterio e ideas emitidas en el presente trabajo de investigación titulado "EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DEL AGUA EMBOTELLADA EN LA PROVINCIA BOLÍVAR A TRAVÉS DE ANÁLISIS BIOMOLECULARES (PCR) Y CULTIVOS MICROBIOLÓGICOS" es de mi exclusiva responsabilidad en calidad de autor previo a la obtención de título de Ingeniero en Agroindustrial, a través de la facultad Ciencias Agropecuarias recursos Naturales y del Ambiente, de la Universidad Estatal de Bolívar, es mi autoría, este documento no ha sido previamente presentando por ningún grado de calificación profesional y que las referencia bibliográficas que se incluyen han sido consultadas por los actores. Es todo cuanto puedo declarar en honor a la verdad, la misma que la hago para los fines legales pertinentes. HASTA AQUÍ LA DECLARACIÓN JURADA. La misma que elevada a escritura pública con todo su valor legal. Para el otorgamiento de la presente escritura pública se observaron todos los preceptos legales del caso, leída que les fue al compareciente por mí el Notario en unidad de acto, aquel se ratifica y firma conmigo de todo lo cual doy Fe.

LLANOS GARCIA FRANCISCO ANDRES

C.C. 0202401046

AB. HENRY ROJAS NARVAEZ

NOTARIO PUBLICO TERCERO DEL CANTON GUARANDA



EL NOTA....

NOMBRE DEL TRABAJO	AUTOR
<b>Tesis Francisco Llanos.docx</b>	<b>Francisco Llanos</b>
RECuento DE PALABRAS	RECuento DE CARACTERES
<b>21918 Words</b>	<b>123425 Characters</b>
RECuento DE PÁGINAS	TAMAÑO DEL ARCHIVO
<b>123 Pages</b>	<b>23.3MB</b>
FECHA DE ENTREGA	FECHA DEL INFORME
<b>Dec 18, 2023 11:18 AM GMT-5</b>	<b>Dec 18, 2023 11:20 AM GMT-5</b>

● **8% de similitud general**

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para cada base

- 8% Base de datos de Internet
- Base de datos de Crossref
- 4% Base de datos de publicaciones
- Base de datos de contenido publicado de Cross

● **Excluir del Reporte de Similitud**

- Base de datos de trabajos entregados
- Bloques de texto excluidos manualmente
- Fuentes excluidas manualmente



---

**Ing. Darwin Núñez Mg**  
e-mail: danuñez@ueb.edu.ec  
C.I.0201977576  
**TUTOR**

## **DEDICATORIA**

El presente trabajo investigativo va dedicado primeramente a Dios ya que sin él no hubiese sido posible llegar hasta esta etapa de mi vida brindándome siempre sabiduría, salud, inteligencia y cuidando siempre de mí y de mi familia dándome siempre fuerzas y energía para seguir adelante. A mis padres Ángel Llanos, Teresa García, hermanos y tíos por haberme apoyado de manera incondicional tanto moralmente como económicamente siendo un pilar importante en esta etapa, sin ellos este paso tan importante en mi vida no hubiese sido posible, a mis docentes quienes supieron impartir sus conocimientos los cuales son y fueron necesarios e indispensables para poder llegar a culminar esta carrera.

*Francisco Llanos*

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco a Dios por cuidarnos y darnos sabiduría, guiándonos a lo largo de toda la vida siempre por un buen camino, dándonos fortaleza en los momentos más difíciles que se han presentado en todo el proceso. A nuestros padres por ser quienes nos apoyaron siempre presentándose en ocasiones adversidades, pero logrando de una manera u otra salir adelante dándonos siempre palabras de motivaciones para no caer en el transcurso de toda esta etapa gracias infinitas.

Nuestro más sincero y profundo agradecimiento a nuestra alma mater la Universidad Estatal De Bolívar, a la Facultad De Ciencias Agropecuarias Recursos Naturales y del Ambiente y especialmente a la Carrera de Agroindustrias quien nos acogió y nos abrió las puertas para que nos formemos y seamos parte de ella.

De manera especial a todos nuestros docentes que gracias a su sabiduría, experiencia y conocimientos nos supieron enseñar y motivarnos tanto profesionalmente como personalmente reflejando siempre principios y valores que son muy importantes para el resto de nuestras vidas.

*Francisco Llanos*

## ÍNDICE DE CONTENIDOS:

<b>Contenido</b>	<b>Pág.</b>
DEDICATORIA .....	V
AGRADECIMIENTO .....	VI
ÍNDICE DE CONTENIDOS: .....	VII
ÍNDICE DE TABLAS .....	XIII
ÍNDICE DE FIGURAS .....	XV
RESUMEN.....	XVIII
ABSTRACT.....	XIX
CAPÍTULO I.....	1
1.1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.2. PROBLEMA.....	3
1.2.1. Descripción del problema. ....	3
1.3. OBJETIVOS .....	5
1.3.1. Objetivo general. ....	5
1.3.2. Objetivos Específicos.....	5
1.4. HIPÓTESIS.....	6
1.4.1. Hipótesis nula ( $H_0$ ).....	6
1.4.2. Hipótesis Alternativa ( $H_i$ ) .....	6
CAPITULO II .....	7
2. MARCO TEÓRICO.....	7
2.1. Agua.....	7
2.1.1. Generalidades del agua .....	7
2.1.2. Agua embotellada.....	7
2.1.3. Calidad del agua.....	8
2.1.4. Estándares de calidad para el agua embasada.....	10

2.1.5. Tipos de agua embotellada.....	10
2.1.6. Clasificación del agua embotellada.....	11
2.1.9. Regulaciones para el agua embotellada. ....	15
2.1.10. Requisitos sanitarios de los procesadoras de agua. ....	15
2.1.11. Embotelladoras de agua en la Provincia Bolívar. ....	16
2.2. Biología molecular.....	17
2.2.1. Análisis (PCR) Reacción en Cadena de la Polimerasa en aguas. ....	18
2.2.2. Electroforesis.....	19
2.2.3. Microbiología del agua .....	19
2.2.4. Microorganismos .....	19
2.2.5. Bacterias.....	19
2.2.6. Bacterias.....	21
2.3. Tipos de cultivo.....	24
2.3.1. Cultivo puro oxénico .....	24
2.3.2. Cultivo mixto .....	24
2.4. Técnicas de cultivo en placa .....	24
2.4.1. Técnica por estría en superficie.....	24
2.4.2. Técnica de siembra para aislamiento por estría múltiple.....	25
2.4.3. Técnica de cuatro cuadrantes. ....	25
2.4.4. Técnica por agotamiento o en superficie. ....	26
2.4.5. Técnica de siembra masiva. ....	26
2.4.6. Técnica de siembra por punción. ....	27
2.4.7. Técnica de siembra por dilución .....	27
2.5. Técnicas de siembra para tubos.....	28
2.5.1. Siembra en tubos por estría simple. ....	28
2.5.2. Siembra en tubos por picadura. ....	28

2.5.4. Siembra por inoculación o agitación.....	29
2.6. Tipos de medio de cultivo según su función.....	30
2.6.1. Medio general.....	30
2.6.2. Medio selectivo.....	30
2.6.3. Medio diferencial .....	30
2.6.4. Medio de enriquecimiento o nutritivo.....	30
2.6.5. Medio mínimo.....	31
2.7. Tipos de agar .....	31
2.7.1. Agar/Caldo LB (Luria Bertani) o Agar caldo Millers LB. ....	31
2.7.2. Agar sangre.....	31
2.7.3. Agar chocolate .....	31
2.7.4. Agar MacConkey .....	31
2.7.5. Agar sabouraud .....	32
2.7.6. Agar entérico de hektoen. ....	32
2.7.7. Agar Müller -Hinton. ....	32
2.7.8. Agar Xilosa -Lisina-Desoxicolato (XLD).....	32
2.7.9. Agar verde brillante.....	33
2.7.10. Agar triptona -soja (TSA) .....	33
2.7.11. <i>Listeria</i> agar cromogénico.....	33
CAPITULO III.....	34
3. MARCO METODOLÓGICO .....	34
3.1.1 Localización de la investigación .....	34
3.1.2. Situación geográfica y climática. ....	34
3.1.3. Zona de vida.....	35
3.2. Materiales .....	35
3.2.1. Material experimental. ....	35

3.2.2. Materiales de oficina. ....	35
3.2.3. Materiales de Laboratorio. ....	35
3.2.3. Equipos.....	36
3.3. Métodos.....	37
3.3.1. Factores en estudio.....	37
3.3.2. Tratamientos.....	37
3.3.3. Características del experimento. ....	38
3.3.4. Tipo diseño experimental o estadístico. ....	38
3.4. Métodos de evaluación y datos a tomarse.....	39
3.4.1. Variable de respuesta. ....	39
3.5. Georreferenciación.....	40
3.5.1. Recolección de datos.....	40
3.6. Manejo del experimento.....	40
3.6.1. Obtención De Muestras.....	40
3.6.2. Codificación e identificación de las muestras.....	40
3.6.3. Registro de las muestras.....	41
3.9. Análisis Microbiológicos.....	46
3.9.1. Aislamiento de <i>E. Coli</i> .....	46
3.9.2. Aislamiento de <i>Listeria</i> .....	47
3.9.3. Aislamiento de <i>Salmonella</i> .....	48
3.9.4. Tinción de Gram. ....	49
3.10. Análisis Molecular (PCR) Reacción en cadena de la polimerasa. ....	49
3.11. Tabulación.....	52
CAPITULO IV.....	53
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	53
4.1. Resultados de georreferenciación con coordenadas mediante GPS.....	53

4.3. Resultados microbiológicos .....	56
4.3.1. Cuantificación de <i>Listeria</i> de las muestras de agua embotellada de las diferentes empresas que existen en la provincia Bolívar .....	56
4.3.2. Aislamiento, purificación e identificación microscópica de las colonias de <i>Listeria</i> presentes en las muestras de agua embotellada de las empresas que expenden en la provincia Bolívar.....	57
4.3.3. Cuantificación de <i>E. coli</i> de las muestras de agua embotellada de las diferentes empresas.....	60
4.3.4. Aislamiento, purificación e identificación microscópica de las colonias de <i>E. Coli</i> presentes en las muestras de agua embotellada de las empresas que expenden en la Provincia Bolívar.....	61
4.3.5. Cuantificación de <i>Salmonella</i> de las muestras de agua embotellada de las diferentes empresas.....	64
4.3.6. Aislamiento, purificación e identificación microscópica de las colonias de <i>Salmonella</i> presentes en las muestras de agua embotellada de las empresas que expenden en la provincia Bolívar.....	65
4.3.7. Identificación de <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Salmonella spp.</i> y <i>Escherichia coli</i> mediante Reacción de Cadena Polimerasa (PCR). .....	67
4.3.8. Concentración y calidad de ADN extraída mediante Genomic DNA Mini kit k182001.....	68
4.4. Análisis molecular.....	70
4.4.1. Detección de <i>Listeria monocytogenes</i> mediante reacción de cadena de polimerasa (PCR).....	70
4.4.3. Detección de <i>Salmonella spp.</i> mediante reacción de cadena de polimerasa (PCR).....	72
4.4.4. Frecuencias y porcentajes para casos positivos .....	75
4.5. COMPROBACIÓN DE LA HIPÓTESIS .....	79
4.5.1. Hipótesis nula ( $H_0$ ).....	79
4.5.2. Hipótesis Alternativa ( $H_i$ ) .....	79

4.5.3. Verificación de hipótesis.....	79
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	80
5.1. Conclusiones .....	80
5.2. Recomendaciones.....	81
6. BIBLIOGRAFÍA. ....	82
7. ANEXOS. ....	95
7.6. Glosario de términos Técnicos.....	113

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N°	Descripción	Pág.
1	Requisitos físicos para el agua purificada.....	8
2	Requisitos microbiológicos.....	9
3	Clasificación Taxonómica de <i>Escherichia coli</i> .....	21
4	Requisitos microbiológicos para el agua purificada envasada y el agua purificada mineralizada envasada .....	22
5	Taxonomía de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	22
6	Taxonomía <i>Salmonella</i> .....	23
7	Aspectos generales del territorio.....	34
8	Datos de la situación climática y geográfica.....	34
9	Factores de estudio.....	37
10	Tratamientos.....	38
11	Características del diseño.....	38
12	Modelo de Análisis de varianza ANOVA.....	39
13	Codificación, identificación registro de las muestras y origen. ....	41
14	Cebadores específicos utilizados en esta investigación .....	50
15	Reactivos PCR para <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella spp.</i> .....	51
16	Condiciones para el proceso de (PCR) para <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella spp.</i> .....	51
17	Resultados de georreferenciación con coordenadas mediante GPS.....	53
18	Valores obtenidos mediante resultados microbiológicos del primer, segundo y tercer muestreo. ....	56
19	Identificación y diferenciación microscópica mediante tinción de gram de las colonias aisladas de <i>Listeria</i> de las muestras de agua purificada y embotellada. .	57
20	Anova para <i>Listeria</i> .....	58
21	Pruebas de Múltiple Rangos para <i>Listeria</i> por el método de Tukey HSD. ....	58
22	Valores obtenidos mediante resultados microbiológicos del primer y segundo muestreo. ....	60

23	Identificación y diferenciación microscópica mediante tinción de gram de las colonias aisladas de <i>E. Coli</i> de las muestras de agua purificada y embotellada. . .	61
24	Anova <i>Escherichia coli</i> . . . . .	62
25	Pruebas de Múltiple Rangos para <i>Escherichia coli</i> por el método de Tukey HSD. . . . .	62
26	Valores obtenidos mediante resultados microbiológicos del primer y segundo muestreo. . . . .	64
27	Identificación y diferenciación microscópica mediante tinción de gram de las colonias aisladas de <i>Salmonella spp.</i> de las muestras de agua purificada embotellada. . . . .	65
28	Anova para <i>Salmonella spp.</i> . . . . .	65
29	Pruebas de Múltiple Rangos para <i>Salmonella</i> por el método de Tukey HSD. . . . .	66
30	Concentración de ADN mediante Espectrofotómetro Nanodrop para <i>Listeria monocytogenes</i> . . . . .	68
31	Concentración de ADN mediante Espectrofotómetro Nanodrop para <i>Escherichia coli</i> . . . . .	69
32	Concentración de ADN mediante Espectrofotómetro Nanodrop para <i>Salmonella</i> . . . . .	69
33	Resultados de ADN extraído y analizado mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de <i>Listeria monocytogenes</i> . . . . .	73
34	Resultados de ADN extraído y analizado mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de <i>Escherichia coli</i> . . . . .	74
35	Resultados de ADN extraído y analizado mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de <i>Salmonella spp.</i> . . . . .	75
36	Tabla de frecuencias y porcentajes para casos positivos de <i>Listeria monocytogenes por PCR</i> . . . . .	75
37	Tabla de frecuencias y porcentajes para casos positivos de <i>Escherichia coli</i> . . . . .	76
38	Tabla de frecuencias y porcentajes para casos positivos de <i>Salmonella spp.</i> . . . . .	76

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N°	Descripción	Pág.
1	Estructura del agua.....	7
2	Calidad del agua.....	10
3	Tipos de Agua embotellada.....	11
4	Agua gasificada.....	12
5	Cámara de ozono para el agua. ....	14
6	Esquema del Mecanismo PCR.....	18
7	Bacterias presentes en el agua.....	20
8	Contaminación por <i>Salmonella</i> . ....	24
9	Cultivo por estría en superficie. ....	25
10	Aislamiento por estría múltiple.....	25
11	Cultivo mediante cuatro cuadrantes.....	26
12	Siembra por agotamiento en superficie.....	26
13	Siembra masiva en placa.....	27
14	Siembra por punción en placa.....	27
15	Siembra por dilución.....	28
16	Siembra en tubos por estría simple. ....	28
17	Siembra por picadura en tubo. ....	29
18	Siembra por picadura y estría.....	29
	Siembra por agitación. ....	30
20	Georreferenciación de las empresas embotelladoras de agua en la Provincia Bolívar.....	55
21	Medias de los porcentajes de <i>Listeria</i> .....	59
22	Medias de los porcentajes de <i>Escherichia coli</i> . ....	63
23	Medias de los porcentajes de <i>Salmonella spp.</i> .....	67
24	Resultados de electroforesis después de realizar PCR con los aislados de <i>Listeria</i> donde pb es el marcador de peso molecular, L+ es el control positivo y T son las muestras de ADN. ....	71

25 Resultados de electroforesis después de realizar PCR con los aislados de <i>Escherichia coli</i> donde pb es el marcador de peso molecular E+ es el blanco positivo y T son las muestras de ADN.....	72
26 Resultados de electroforesis después de realizar PCR con los aislados de <i>Salmonella spp.</i> donde pb es el marcador de peso molecular S+ es el control positivo y T son las muestras de ADN.....	73

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo N°</b>	<b>Descripción</b>	<b>Pág.</b>
1	Mapa de ubicación de la investigación .....	95
2	Cronograma de actividades .....	97
3.	Presupuesto .....	98
4	Formatos de fichas de recolección de datos.....	100
5	Georreferenciación.....	105
6	Análisis físico-químicos.....	106
7	Análisis microbiológicos.....	107
8	Extracción de ADN mediante mini kit y electroforesis .....	110

## RESUMEN

El presente proyecto investigativo titulado “Evaluación De La Calidad Del Agua Embotellada en la Provincia Bolívar a Través de Análisis Biomoleculares (PCR) y Cultivos Microbiológicos, tiene como objetivo evaluar la calidad microbiológica del agua embotellada de las diferentes empresas que existen en la Provincia Bolívar a través de análisis biomoleculares (PCR) y cultivos microbiológicos, teniendo como principales objetivos, determinar la calidad del agua mediante el uso de medios de cultivos específicos para el desarrollo de microorganismos. Caracterizar si existe la presencia de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.* y *Escherichia coli* mediante técnicas de biología molecular (PCR) Reacción en cadena de la Polimerasa en tiempo final. Se planteo un diseño completamente al azar (DCA) con arreglo factorial A x B (5 x2) con tres repeticiones. La técnica molecular fue el resultado tras la purificación de microorganismos obtenidos de las muestras mediante medios de cultivos selectivos y diferenciales todas estas en unidades UFC/mL. Con el empleo de estas dos metodologías se analizó un total de 11 marcas de agua embotellada de la provincia Bolívar las cuales fueron provenientes de cada una de las empresas embotelladoras. Se utilizo cebadores específicos de la marca invitrogen para detectar el gen tanto de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp* y *Escherichia coli* con su serotipo O157:H7 y utilizando para un mejor resultado blancos positivos de los tres microorganismos que fueron adquiridos por el departamento de investigación. Se logro detectar *Listeria monocytogenes* en un 54% (6/11), para *Escherichia coli* 36 % (4/11) y para *Salmonella spp.* 18% (6/11) para cada una de las muestras mismas que fueron interpretadas mediante electroforesis. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue más sensible para *Escherichia coli*, O157:H7 y *Listeria monocytogenes* dando resultados exactos en conjunto con los blancos positivos. En conclusión, la presencia de estas bacterias en el agua embotellada puede considerarse un factor de riesgo para la salud y bienestar para el consumidor.

**Palabras clave:** *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, cultivos selectivos, Análisis Biomoleculares, electroforesis.

## ABSTRACT

The present research project entitled "Evaluation of Bottled Water Quality in the Bolivar Province through Biomolecular Analysis (PCR) and Microbiological Cultures, aims to evaluate the microbiological quality of bottled water from different companies in the Bolivar Province through biomolecular analysis (PCR) and microbiological cultures, having as main objectives to determine the quality of water through the use of specific culture media for the development of microorganisms. To characterize the presence of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.* and *Escherichia coli* by means of molecular biology techniques (PCR) Polymerase Chain Reaction in final time. A completely randomized design (CRD) with factorial arrangement A x B (5 x 2) with three replicates was used. The molecular technique was the result after purification of microorganisms obtained from the samples by means of selective and differential culture media, all of them in CFU/mL units. With the use of these two methodologies, a total of 99 samples of bottled water were analyzed equally from each of the water bottling companies in the different cantons of the Bolivar province. Specific primers of the Invitrogen brand were used to detect the serotype of both *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* with its serotype O157:H7 and *Salmonella spp* using positive targets of the three microorganisms that were acquired by the research department for a better result. *Listeria monocytogenes* was detected in 91,6% (12/11), for *Escherichia coli* 75% (9/99) and for *Salmonella spp.* 50% (6/11) for each of the samples, which were interpreted by electrophoresis. The polymerase chain reaction (PCR) was more sensitive for *Escherichia coli*, O157:H7 and *Listeria monocytogenes* giving accurate results in conjunction with the positive blanks. In conclusion, the presence of these bacteria in bottled water can be considered a health and welfare risk factor for the consumer.

**Key words:** *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, selective cultures, Biomolecular Analysis, electrophoresis.

# CAPÍTULO I

## 1.1. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial las enfermedades son causadas por un inadecuado tratamiento de agua, esto ocasiona una contaminación cruzada en las redes de distribución y planta afectando a quien lo consume. La OMS define al agua para consumo como aquella que no produce ningún daño significativo en el organismo siendo esta consumida durante toda la vida. El mal manejo de la calidad del agua puede conllevar enfermedades que afectan directamente a la salud de las personas. Las normas establecidas y destinadas para el adecuado manejo del agua de consumo ayudan a mantener un control y proporcionan así beneficios para la salud (Organización Mundial de la Salud (OMS), 2018).

Es por esa razón que la mayor parte de la población tiene desconfianza al momento consumir agua no tratada debido a su calidad, por esta razón las personas optan por consumir agua embotellada de marcas reconocidas, dejando a un lado a las nuevas marcas de aguas.

Hoy en día existe un alto crecimiento de las industrias procesadoras de agua embotellada para consumo teniendo un porcentaje anual de un 7% a nivel mundial existiendo así la posibilidad de que estas no manejen un buen control de aguas y no cumplen con los estándares requeridos provocando que en el agua exista contaminación de diferentes compuestos.

En el Ecuador se asemeja a la misma realidad. Según Euromonitor Internacional en el último reporte en el año 2018 el consumo de agua purificada embotellada se ubicó en 41 litros por persona disminuyendo significativamente el consumo de bebidas azucaradas y gaseosas (Espol, 2022). Pero así mismo ha generado desconfianza debido a que algunos embaces de agua presentan sabores ajenos al mismo generando una duda de la calidad de agua de lo que se está consumiendo. En algunos casos las marcas de algunas empresas de agua no poseen información del producto como es su fecha de expedición, vencimiento y el número de lote en el que fue embazado dando la idea de que no se están cumpliendo las normas y los estándares de calidad.

El agua que se utiliza para ser embotellada puede contener contaminantes ya sean estos de nivel químico o microbiológicos llegando a desarrollarse un crecimiento de diferentes patógenos y concentraciones de diferentes sustancias químicas que son perjudiciales para la salud. Esta posible contaminación variara dependiendo las marcas de agua, lugar,

origen, equipos que se utilizan para la manipulación del mismo, ventilación, exposición con animales durante el proceso de embotellado también al momento de su almacenamiento y transporte. Así mismo hoy en día el uso de las técnicas biomoleculares ayudan a permitir el estudio y detección de secuencias específicas de ADN ya sean cortas o alargadas y genomas completos permitiendo la detección y replicación del material genético como son sus ácidos nucleicos que constituyen las características específicas como son su especie y las modificaciones que se las puede realizar. Es por ello que en el presente trabajo de carácter investigativo se tiene como objeto estudiar y analizar la calidad del agua de las procesadoras de agua embotellada que existen Provincia Bolívar y que a su vez son expandidas a nivel de la Provincia determinando así los principales patógenos que pueden afectar al agua y estudiándolos mediante técnicas biomoleculares.

## **1.2. PROBLEMA.**

### **1.2.1. Descripción del problema.**

Actualmente las personas llevan un ritmo de vida acelerado ya sea por circunstancias de trabajo, deporte o viajes hace que su consumo de agua sea más requerido, siendo esta la principal fuente de hidratación, dando lugar a la producción a gran escala de un producto envasado que se lo puede adquirir en cualquier tienda de abastos, estando a si al alcance de todas las personas sin importar el tiempo de vida útil ni la manera que se encuentra almacenada, existiendo riesgos de consumir estos productos por un mal tratamiento de conservación.

En el Ecuador las diferentes compañías que producen y embotellan agua para consumo tienen a su favor las diferentes temperaturas que se manejan por regiones y gracias a ello se mueve el consumo de bebidas, motivando así a las empresas a crear nuevos productos. Según la Agencia De Regulación Y Control Sanitario a nivel nacional existen un total de 985 plantas purificadoras y embotelladoras de agua (ARCSA, 2020).

El 22,2% de hogares tienen la incertidumbre de consumir agua embotellada por la razón de que al momento de ser comercializada estas no cumplen con las normas vigentes, observándose en ocasiones que en el envase no poseen registros sanitarios, fecha de elaboración, caducidad, número de lote y etiquetados mal realizados dando lugar a una poca aceptabilidad del producto y a la misma vez analizando si el producto es manejado bajo estándares de calidad (Molina & Pozo, 2018).

Según estudios de entidades como Unicef y Banco Mundial el 17,8% de agua embotellada en Ecuador posee contaminantes tanto químicos como microbiológicos. (Relief, 2017).

El consumo de agua embotellada ha aumentado considerablemente en la provincia Bolívar. En donde, existen diferentes empresas embotelladoras del mismo que lo procesan siendo estas expendidas a los diferentes puntos de venta.

Mediante observaciones se puede constatar que la venta del agua embotellada puede sufrir afectaciones como contaminación cruzada y turbar su composición debido a que estos productos son expuestos a la luz del sol (rayos solares) generando así que la botella de plástico suelte sustancias como bisfenol A (BPA) y dioxinas que son peligrosas cuando entran en calor; así mismo las altas temperaturas ayudan al desarrollo

microorganismos como *Escherichia coli*, coliformes totales ,fecales afectando al organismo del individuo (Gibbens, 2022). Las botellas con agua para el consumo tienen condiciones estrictas para su acopio teniendo mucho que ver las temperaturas en las que son almacenadas dependiendo mucho de ello su calidad.

Es por ello que en esta investigación se pretende analizar e identificar mediante análisis biomoleculares (PCR) y microbiológicos la calidad del agua de las diferentes empresas embotelladoras de agua que procesan y expenden en la provincia para a si verificar la calidad del mismo.

## **1.3. OBJETIVOS**

### **1.3.1. Objetivo general.**

Evaluar la calidad microbiológica del agua embotellada en la Provincia Bolívar a través de análisis biomoleculares (PCR) y cultivos microbiológicos.

### **1.3.2. Objetivos Específicos.**

1. Determinar la calidad del agua mediante el uso de medios de cultivos específicos para el desarrollo de microorganismos.
2. Caracterizar si existe la presencia de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. y *Escherichia coli* mediante técnicas de biología molecular (PCR) Reacción en cadena de la Polimerasa en tiempo final.

## **1.4. HIPÓTESIS.**

### **1.4.1. Hipótesis nula (H<sub>0</sub>)**

Cada (PCR) reacción en cadena de la polimerasa en tiempo final en el agua de las empresas embotelladoras de la Provincia Bolívar para consumo humano no se confirma la presencia de *Listeria*, *Salmonella* y *Escherichia coli* que afectan la calidad microbiológica del agua embotellada purificada.

$$H_0: \mu_1 = \mu_1$$

### **1.4.2. Hipótesis Alterna (H<sub>i</sub>)**

Cada (PCR) reacción en cadena de la polimerasa en tiempo final en el agua de las empresas embotelladoras de la Provincia Bolívar para consumo humano se confirma la presencia de *Listeria*, *Salmonella* y *Escherichia coli* que afectan la calidad microbiológica del agua embotellada purificada.

$$H_i: \mu_1 \neq \mu_1$$

## CAPITULO II

### 2. MARCO TEÓRICO.

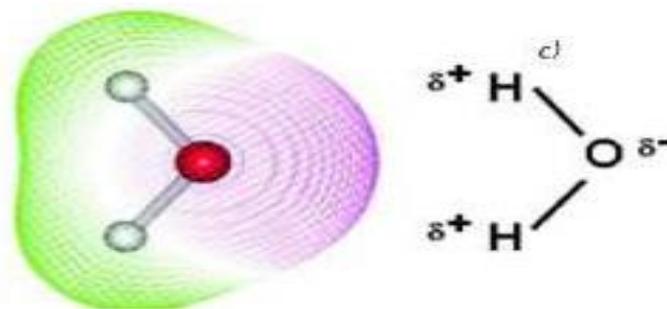
#### 2.1. Agua

##### 2.1.1. Generalidades del agua

El agua es considerada una sustancia líquida que posee características como no tener sabor, olor y color encontrándose en la naturaleza, su molécula está compuesta por dos átomos de hidrógeno y también uno de oxígeno unidos a sí mediante un enlace covalente. Esta molécula del agua tiene una estructura denominada dipolar dándole a sí una gran ventaja para disolver cualquier tipo de sustancias conociéndole como disolvente universal (IGME, 2022).

#### Figura 1

*Estructura del agua.*



*Nota:* Tomado de: Peralta (2022).

##### 2.1.2. Agua embotellada

El Agua embotellada o preservada mediante envases plásticos es agua potable que es depositada en botellas individuales de diferentes tamaños teniendo diferentes calidades en un promedio de medio-alto dependiendo la temperatura en la que será almacenada ya sea en frío o al ambiente estas pueden ser agua purificada, manantial, pozo, glacial o grifo.

Según Torres (2018), el material que es fundamental a utilizar para el proceso de embotellamiento de agua es tereftalato de polietileno comúnmente dirigido para botellas de agua por lo que no presenta riesgos algunos para la salud. Pero en caso de que exista una contaminación son difíciles de analizar y es muy complejo detectar los componentes tóxicos que estos poseen, pero si hay la posibilidad de que contenga bisfenol (Waterlogic, 2019).

### 2.1.3. Calidad del agua

La calidad del agua es la que está adecuada y enfocada para el consumo humano cumpliendo características químicas, microbiológicas, físicas y organolépticas. Dependiendo las características según su uso y función de su calidad que presenta el agua tenemos: Aguas residuales, potables, embotelladas, de usos para riego todos estos basados mediante normativas de regulación que son determinadas por el (MAE) Ministerio Del Ambiente y Agua, INEN y el (ARCSA) que es la Agencia nacional de regulación control y vigilancia sanitaria los cuales son los entes encargados de los análisis de caracterización de las aguas a tratarse dándonos a conocer mediante indicadores la concentración o calidad en la que se encuentra (Villa, 2022).

**Tabla 1**

*Requisitos físicos para el agua purificada*

Requisito	Unidad	Min	Máx.	Método de ensayo
Color	Pt-Co <sup>b</sup>	-	5	NTE INEN-ISO 7887
Turbidez	NTU <sup>a</sup>	-	1	NTE INEN-ISO 7027
Solidos Totales				
Disueltos				
Aguas purificadas	mg/L	-	500	2540 solidos Standard Métodos
Envasadas				
Solidos totales aguas purificadas				
mineralizadas	mg/L	500	1000	2540 solidos Estándar Métodos
Envasadas				
pH a 20 °C agua purificada envasada		4,5	9,5	NTE INEN-ISO 10523
pH a 20 °C agua Purificada mineralizada		3,8	9,0	NTE INEN-ISO 10523
Envasada				
Cloro l residual	mg/l	Ausencia		INEN. 977
Dureza t.	mg/l.	-	300	INEN 974

Unidad en la escala PT-CO = mg/l de platino en forma de cloro platino  
 Unidad nefelometría turbidez (NTU) = 1 mg/L de formazina estándar.

*Nota:* Datos tomados del Instituto Ecuatoriano de Normalización INEN(2017).

**Tabla 2***Requisitos microbiológicos*

<b>Requisito</b>	<b>Unidad</b>	<b>Caso</b>	<b>n</b>	<b>c</b>	<b>m</b>	<b>M</b>	<b>Método de ensayo</b>
<i>Listeria</i>	UFC/100mL	10 <sup>a</sup>	5	0	0	---	ISO
<i>Monocytogenes</i>							9001:2015
<i>E. coli</i>	UFC/100mL	10 <sup>a</sup>	5	0	0	---	NTE INEN-ISO 9308-1
<i>Salmonella</i>	UFC/100mL	10 <sup>a</sup>	5	0	0	---	ISO 19250:2013

*Nota:* Datos tomados del Instituto Ecuatoriano de Normalización INEN(2017).

En lo cual:

El caso **10<sup>a</sup>** representa peligro grave incapacitante, pero no amenaza con la vida las secuelas proporcionadas son de corta duración.

**(c):** es el número de muestras admisibles con resultados entre m y M

**M:** es el límite máximo el cual no se acepta.

**(m):** es el límite máximo de aceptación.

**(n):** es el número de muestras a analizar.

Las normas de estos entes reguladores se basan en los niveles de toxicidad que deben encontrarse dentro del rango aceptable tanto para personas como animales y animales acuáticos. Para el agua potable estas normas se establecen para asegurar una fuente de agua aséptica y sana para el consumo mediante esta manera se cuida la salud de las personas.

El mal tratamiento del agua influye drásticamente sobre la cantidad y calidad del agua de diferentes formas. El agua mal tratada y contaminada no puede utilizarse para el consumo como es el caso de las industrias procesadoras de alimentos y la agricultura son los principales causantes de la contaminación debido a que no tienen un buen tratamiento generando así un sin número de desechos que son vertidos en ríos (Oppliger, 2019).

La Agencia Nacional De Regulación Control y Vigilancia Sanitaria (ARCSA) es el ente encargado de verificar el cumplimiento de la normativa en la plantas potabilizadoras y procesadoras de agua embotellada en lo cual en caso de que esta no cumpla con los requisitos específicos ellos se encargan de realizar los análisis microbiológicos para verificar la calidad de este líquido (Edicion Medica, 2021).

## Figura 2

### Calidad del agua



*Nota:* Tomado de Lablouispasteur (2018).

#### **2.1.4. Estándares de calidad para el agua embazada.**

La (OMS) es el ente encargado de establecer las normas para la calidad del agua purificada y embazada por tal motivo es la base para el decreto de las reglas y seguridad del agua. Los estándares de calidad de cada territorio para el agua se centran en los límites tanto máximos como mínimos para así regular los posibles contaminantes que pueden existir lo cual presentan un debido riesgo de afectar a la salud de todos los que lo consumen por tal razón dependiendo el establecimiento de cada país se adapta de acuerdo a sus posibilidades económicas y ambientales manteniendo controles día a día para así obtener un a agua de calidad (OMS, 2018).

Para instaurar los estándares apropiados para el agua purificada la Organización Mundial de la Salud debe establecer una investigación descriptiva y así mismo un análisis que ayude comprobar si los estándares cumplen con su objetivo establecido encargándose así de concretar y definir las normas las cuales son adoptadas e implementadas para algunos territorios a nivel mundial voluntariamente debido a que cada país tiene libre albedrío de concretar e implementar sus propias normas pudiendo ser menores ,iguales o más rigurosas que las establecidas por la OMS (Truque, 2018). Los estándares de calidad para el agua embotellada determinan los límites máximos y mínimos de diferentes aditivos permitiditos en el mismo y sus diferentes requerimientos para su investigación y seguimiento incluyendo contaminantes como microorganismos, pesticidas, así mismos contaminantes tanto orgánicos como inorgánicos (Byram, 2021).

#### **2.1.5. Tipos de agua embotellada.**

Actualmente existen empresas que producen una infinidad de agua embotellada generando así una pequeña confusión al momento de elegir el embace con el producto

por lo que el agua dependiendo la marca es diferente. Cada agua procesada y embazada ya sea mineral natural, ionizada y manantial tienen diferentes características y aportes a nuestro organismo debido a sus tratamientos que pasan hasta llegar al proveedor y ser expandidas, dando a sí la opción de elegir de acuerdo a la necesidad del consumidor (Desabad, 2020).

### **Figura 3**

*Tipos de Agua embotellada*



*Nota:* Tomado de Bigstock (2020).

Los diferentes tipos de agua embazada no deben poseer colorantes saborizantes extractos o esencias ni azúcares que alteren al mismo. El agua purificada, carbonatada, manantial, ionizada y embazada son sometidas a tratamientos fisicoquímicos y de desinfección de microorganismos y son embotelladas con tapas de cierre hermético por lo que son inmanipulables hasta que llegue al consumidor garantizando así que la botella no haya sido destapada después del llenado del líquido y antes de ser comercializadas con el cliente cumpliendo así con los requisitos estipulados por las normas vigentes (NTE INEN, 2008).

#### **2.1.6. Clasificación del agua embotellada.**

LA FDA cataloga los diferentes tipos de agua embotellada por su origen:

##### **Agua de manantial artesiano.**

Esta agua proviene de un manantial denominado acuífero es decir capas de rocas porosas tanto de arena y tierra que contienen agua encontrándose bajo extrema presión en las mismas.

##### **Agua mineral**

Es proveniente de una fuente subterránea en el cual este líquido contiene un porcentaje de 250 partes por millón de sólidos totales disueltos conteniendo minerales

oligoelementos provenientes del origen teniendo así muchas ventajas como por ejemplo la reducción de los niveles de colesterol, pero en algunos casos no puede ser ingerida por personas hipertensas o diabetes.

Agua proveniente de un manantial.

Esta agua nace de una formación subterránea fluyendo de manera natural hacia la superficie recolectándose solo en el manantial y es comercializada con el nombre de Agua manantial siendo esta agua potable por su naturaleza y mediante análisis microbiológicos es adecuada para el consumo y descartando riesgos de contaminación.

### **Agua gasificada.**

El agua gasificada se llega a obtener mediante un proceso en las plantas de producción en el cual consta de la adicción de una cantidad de ácido carbónico disuelto de acuerdo provocando la reacción de efervescencia todo esto bajo las normativas establecidas vigentes (Desabad, 2020). Su principal ventaja al momento de ingerir esta agua es que ayuda a la secreción de los jugos gástricos mejorando la digestión cuando se consume alimentos pesados.

### **Figura 4**

*Agua gasificada.*



*Nota:* Tomado de: Hammond (2015).

### **Agua tónica.**

El agua tónica es procesada de manera industrial siendo carbonatada artificialmente agregándole quinina. La quinina es de sabor muy amargo por lo que se le adiciona azúcar hasta nivelar el sabor utilizándose más para coctelería.

### **Bebida a base de agua saborizada.**

Es una bebida que no contiene gas dándole un ligero sabor y se lo dulcifica con edulcorantes en mínimas cantidades calóricas y en algunos de estos es posible que

contengan suplementos adicionales. El consumo de estas bebidas dependiendo el enfoque de beneficio ayudan a la circulación protegiendo así los órganos, eliminación de toxinas, lubricación de articulaciones todo esto basándose bajo la norma para el agua saborizada, envasada y comercializada para el consumo (INTECO, 2022)

La presente norma vigente hasta la fecha establece las condiciones que se deben realizar para el proceso de agua saborizada, embotellada y expendida como elaborado final utilizando recipientes de diferentes sustancias y capacidades de volumen destinadas para el consumo de la población diferenciándose de las aguas minerales naturales (INTE A50, 2018).

### **Agua de llave**

El agua embazada también puede ser utilizada de fuentes municipales siendo tratadas antes del embotellamiento algunos de estos incluyen procesos como son:

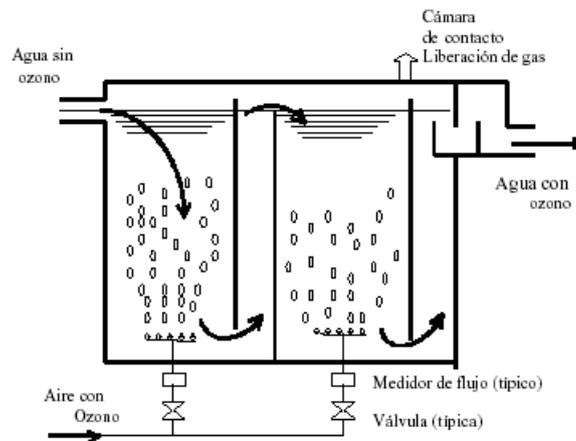
#### **Ozonización.**

Según Valdivieso (2022), el agua ionizada es un proceso de potabilización que trata en diluir el ozono en agua actuando como desinfectante para la eliminación de bacterias, virus y diferentes parásitos ayudando así a la micro floculación agrupando los sólidos presentes destacándose por ser oxidante con diferentes potabilizadores.

Este proceso es ampliamente utilizado en el tratamiento de aguas tanto potables como residuales debido a que ayuda a la separación de compuestos tanto de nivel orgánico como inorgánico reduciendo así su turbidez, olores extraños, color, sabor así mismo sustancias toxicas que el agua puede contener (Llanos & Condo, 2022).

## Figura 5

Cámara de ozono para el agua.



*Nota:* Tomado de Fernández (2017).

## Osmosis inversa

La osmosis inversa para el tratamiento de agua se da mediante un proceso físico químico haciéndolo pasar al líquido mediante membranas semipermeables de diferentes tamaños. Logrando así una eficiente separación de solventes de los solutos que en este proceso llevan disueltos, permitiendo así la separación de un 95 % eliminando así las partículas que puede contener (Ferrovial, 2022).

## Agua mediante proceso de destilación.

Mediante el proceso de destilación el agua se desprovee de las sales minerales, algunos patógenos, electrolitos y posibles sustancias tóxicas o dañinas estando compuesta solamente por oxígeno e hidrogeno que pueden contener el mismo. Por lo cual la calidad de este líquido es muy útil en los sectores de hospitales, laboratorios, e industrias y otras cabe recordar que este líquido no es muy recomendable para el consumo debido al proceso que se lo realiza por la razón de que se eliminan los electrolitos y las sales minerales siendo estas las principales que mantienen a una persona hidratada (AQUAE, 2021).

## Agua mediante proceso de filtración absoluta con el uso de micras.

En este proceso de purificación el agua atraviesa mediante filtros que pueden ser de una micra eliminando las partículas de mayor tamaño a este, incluyendo dentro de estas partículas del microorganismo denominado cryptosporidium causante de infecciones estomacales.

### **Agua sin procesar.**

Se caracteriza por no ser tratada ni filtrada siendo embotellándola directamente de la fuente. Las empresas que estén a cargo del procesamiento de agua purificada embotellada tienen el permiso para comercializarlo legalmente siempre y cuando la fuente de donde emerge el líquido este aprobada por los entes regulatorios y que esta cumpla con los diferentes estándares de calidad estipuladas por las normas INEN evitando exceder límites de diferentes sustancias tóxicas (Catorce , 2019).

#### **2.1.9. Regulaciones para el agua embotellada.**

Las medidas establecidas para el agua embasada cumplen ciertos requerimientos indispensables de calidad tanto microbiológicos y físicos químicos una vez hecho se realiza la distribución a los proveedores para que sea comercializada. La norma INEN establece controles regulatorios para mantener los estándares de calidad dando a conocer los límites admisibles de microorganismos, posibles contaminantes y toxinas presentes cumpliendo con los siguientes requisitos:

- El agua embotellada ya purificada debe manejar y cumplir las buenas prácticas de fabricación y producción.
- El agua embotellada ya purificada debe ser procesada con aguas que cumplan con las Normas Técnicas Ecuatorianas INEN 1108.
- No debe presentar sabores extraños ni olores que no sean identificados del producto.
- El agua embotellada ya purificada o mineralizada una vez en el envase debe cumplir con los requisitos físicos establecidos.
- El agua embotellada ya purificada o mineralizada deberá cumplir con los requisitos microbiológicos establecidos por la presente norma.

#### **2.1.10. Requisitos sanitarios de los procesadoras de agua.**

La planta debe estar bien estructurada y construida debiendo saber que tanto los cielorrasos, techos, paredes y pisos puedan ser sanitizados con las debidas medidas y mantenidas en perfecto estado.

Debe contar con ventilación para evitar posibles olores ajenos, vapores o gases con toxinas y en lo que es lavado aséptico de las botellas impedir las entradas de polvo o humo.

Deberá contar con una distribución adecuada de iluminación protegiendo las áreas de producción siendo siempre luz blanca para evitar alterar los colores.

Debe contar con malla milimétrica por los ductos de ventilación y otros evitando así entrada de animales ajenos al mismo.

Deberá contar con instalaciones adecuadas asépticas para lavarse las manos y disponer de todos los implementos de limpieza.

Debe contar con los comedores y vestidores para el personal de producción ubicándose por separado del área de proceso y almacenamiento.

Al momento de ser llenado, tapado, cerrado etiquetado y empacado deben ser rigurosamente realizados de manera escéptica para evitar así contaminaciones cruzadas (Arteaga & Morocho, 2016).

#### **2.1.11. Embotelladoras de agua en la Provincia Bolívar.**

En la provincia Bolívar en sus diferentes cantones existen empresas que se dedican a la producción de agua embotellada de los cuales tenemos los siguientes:

1. En el cantón Chillanes parroquia san José del tambo se encuentra la empresa ACQUA MIA la cual es dedicada a la elaboración de hielo, bebidas no alcohólicas y agua embotellada.
2. En el cantón Chillanes parroquia san José del tambo en el sector Tombopamba se encuentra la empresa AGUA VITALINA la cual es dedicada a la elaboración de hielo, bebidas no alcohólicas y agua embotellada
3. En el cantón Chillanes parroquia Chillanes se encuentra la empresa AGUA MARIA la cual es dedicada a la elaboración de hielo, bebidas no alcohólicas y agua embotellada
4. En el cantón Chillanes parroquia Chillanes se encuentra la empresa AGUA SAN PEDRO la cual es dedicada a la elaboración de hielo, bebidas no alcohólicas y agua embotellada
5. En el cantón Chillanes parroquia San José del Tambo, ciudadela la Colombia se encuentra la empresa Don Gaibor la cual es dedicada a la elaboración de hielo, bebidas no alcohólicas y agua embotellada
6. En el cantón San Miguel se encuentra la empresa BEBACUA la cual es dedicada a la producción agua embotellada en garrafas.

7. En el cantón Chimbo se encuentra la empresa AQUA PURITECH la cual es dedicada a la producción de agua embotellada
8. En el cantón Guaranda, en la parroquia Julio Moreno se encuentra la empresa AGUA CASHAPAMBEÑA la cual es dedicada a la elaboración agua embotellada.
9. En el cantón Guaranda, en la parroquia Santa Fe se encuentra la empresa AQUA SANTA la cual es dedicada a la elaboración agua embotellada.
10. En el cantón Guaranda, en la parroquia Gabriel Ignacio Veintimilla se encuentra la empresa RELIVE “JS” la cual es dedicada a la elaboración agua embotellada.
11. En el cantón Guaranda, en la parroquia Guanujo se encuentra la empresa AGUA BOLÍVAR la cual es dedicada a la elaboración agua embotellada.
12. En el cantón Caluma, en la parroquia Caluma se encuentra la empresa AGUA PARAÍSO la cual es dedicada a la elaboración de hielo y agua embotellada.
13. En el cantón Caluma, en la parroquia Caluma se encuentra la empresa AGUA PURIFICADA EMBAZADA CALUMA la cual es dedicada a la elaboración de hielo y agua embotellada.
14. En el cantón Caluma, barrio la Fortuna vía la Esmeralda se encuentra la empresa AGUA LA FORTUNA la cual es dedicada a la elaboración de hielo y agua embotellada.
15. En el cantón Caluma, recinto san Vicente se encuentra la empresa AGUA CALUMEÑA la cual es dedicada a la elaboración de hielo y agua embotellada.
16. En el cantón Caluma, recinto LA ALSASIA se encuentra la empresa AGUA DEL VALLE la cual es dedicada a la elaboración de hielo y agua embotellada.
17. En el cantón Caluma, en la avenida la naranja se encuentra la empresa AGUA CALUMITA la cual es dedicada a la elaboración de hielo y agua embotellada.

## **2.2. Biología molecular.**

Se entiende por biología molecular al ente encargado de estudiar, la composición, funciones, estructuras y las moléculas a nivel celular en los diferentes seres vivos. Enfocándose a investigar y estudiar los diferentes ácidos nucleicos y las proteínas como ADN Y ARN que existen en determinados elementos cumpliendo así funciones como recopilar información genética que estas serán transmitidas por generaciones, logrando

ser muy indispensable en diversas áreas de estudio y aplicación por su alta sensibilidad y especificidad al momento de ser analizada en el equipo (García, 2021).

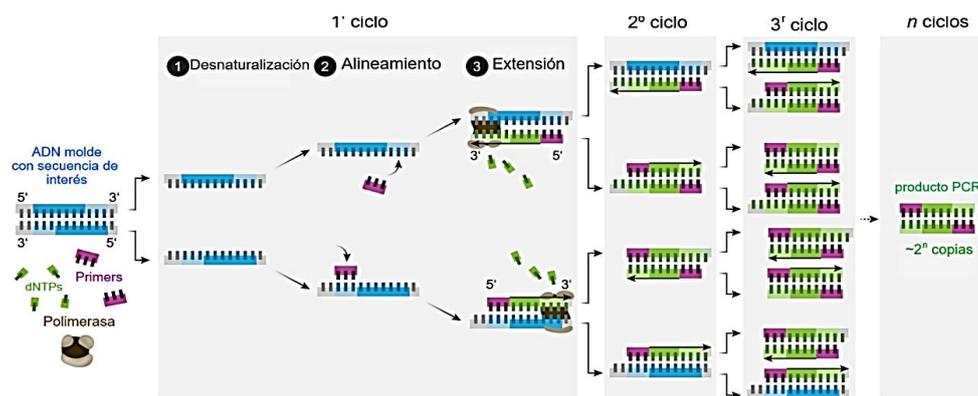
### 2.2.1. Análisis (PCR) Reacción en Cadena de la Polimerasa en aguas.

La (PCR) por sus siglas Reacción en Cadena de la Polimerasa es un método empleado a nivel de laboratorio que permite copias (In vitro) de secuencias específicas de (DNA) ácido desoxirribonucleico de diferentes muestras permitiendo así obtener a partir de una sola muestra millones de copias solamente de un fragmento de ADN.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es indispensable en la investigación de la calidad del agua permitiendo así la identificación, detección y caracterización de diferentes microorganismos por lo que al momento de realizar el procedimiento arroja resultados concretos de especificidad y sensibilidad. Para los laboratorios de control de calidad de alimentos y aguas es muy útil utilizar esta técnica por lo que ofrece el análisis a gran escala de muestras obteniendo los resultados de manera rápida, pero así mismo posee complicaciones al momento de realizar maniobras post-PCR a las muestras obtenidas llegando a ser complicado y la indistinción mediante células vivas o muertas que pueden existir en diferentes casos es recomendable realizar procesos convencionales como la preparación de agares para realizar cultivos y así determinar los resultados requeridos (Arcia, 2018).

**Figura 6**

*Esquema del Mecanismo PCR.*



*Nota:* La figura detalla el proceso de amplificación hasta tener suficientes muestras de ADN. Fuente: Ramirez (2022).

### **2.2.2. Electroforesis**

Es muy utilizada para la apreciación de fragmentos de ADN o proteínas de productos obtenidos mediante PCR, estableciéndose en la capacidad de las moléculas para la migración de matrices solidas o agares que pueden ser de agarosa o poliacrilamida. Se emplea para poder detectar *Listeria*, *Salmonella*, *E coli* entre otros, después de haber pasado por el método de PCR para evaluar la calidad de las aguas para consumo (Urda, 2018).

### **2.2.3. Microbiología del agua**

Para el agua de consumo ya sea embotellada o potable es de vital importancia realizar análisis para la determinación de microorganismos que pueden coexistir en el agua, utilizando y preparando medios de cultivos (agares) para poder identificar la presencia de cada uno de ellos mediante el conteo y la forma que presenta cada patógeno existente.

### **2.2.4. Microorganismos**

Los microorganismos son seres pequeños que no pueden ser vistos por el ojo humano y para poder ser estudiados se usan equipos técnicos como microscopios que permiten visualizar detalladamente las formas que tiene cada individuo. Existiendo diferentes tipos de microbios de diferentes formas y tamaños dentro de estas están las bacterias y las arqueas que son unicelulares procariotas, protozoos que son unicelulares eucariotas y membranas como algas y hongos (Álvarez, Reyes, & González, 2018). Diferentes análisis investigativos en biología molecular utilizan los microorganismos para estudiar y entender fenómenos determinados como la obtención de compuestos y los más principales que afectan a la salud mientras que otros son inofensivos y son parte de nuestro cuerpo. En otros casos son tomados en cuenta como de vida libre en la naturaleza encontrándose especialmente en áreas como superficies, tierra, aguas ya sean estas tratadas o residuales (Uriarte, 2020).

### **2.2.5. Bacterias**

Son seres vivos que están estructurados por una sola célula es decir son unicelulares con un tamaño de 0,5 y,5 (µm micrómetros) siendo de diversas formas como son tipo espirales, esféricas cilíndricas y helicoidales y reproduciéndose mediante fisión binaria o bipartición es decir de manera asexual como es en el caso de los protozoos, bacterias y arqueas. Se encuentran en todo hábitat desarrollarse especialmente en los suelos, en aguas

desechos radio activos, manantiales calientes. De las bacterias que coexisten en el agua tenemos la *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria*, *Salmonella*, *Escherichia coli* entre otros, siendo esta la más perjudicial para las personas por lo que es la responsable del 90% de infecciones multiplicándose de manera intracelular en protozoos y amebas (Aquafree, 2021). Creciendo normalmente en ambientes con suficiente agua y menos ácidos oscilando con un pH de 4 a 9 pero así mismo se desarrollan en presencia del aire denominándose aerobias mientras que en ausencia del oxígeno crecen las anaerobias, las que pueden desarrollarse y vivir con o sin oxígeno son facultativas y las que pueden vivir con una concentración de aire muy baja son denominadas microaerófilos (OPS, 2022).

Los minerales indispensables para que puedan vivir son y hierro, potasio, azufre, calcio, sodio, magnesio y fosforo si se llegaría a tener ausencia de estos minerales el desarrollo y forma de vida se limitan por lo que ya no podrían sobrevivir (Liliana, Lucía, & Diana, 2020).

### **Figura 7**

*Bacterias presentes en el agua.*



*Nota:* Tomado de **Castrejos** (2021).

## 2.2.6. Bacterias

### *Escherichia Coli*

#### Taxonomía

**Tabla 3**

*Clasificación Taxonómica de Escherichia coli*

<b>Taxonomía de <i>Escherichia coli</i></b>	
Especie	<i>Escherichia coli</i>
Familia	Enterobacteriaceae
Genero	Escherichia
Clase	Gamma proteobacteria
Orden	Enterobacteria les
Filo	Proteobacteria
Reino	Bacteria
Dominio	Bacteria

Tomado de: Castellano (2022).

Se encuentra de manera natural en el tracto intestinal de diferentes mamíferos y así mismo en el de las personas encontrándose muy poco en el agua o tierra (suelo) que no haya sufrido contaminación fecal. La presencia *E. coli* en el agua es una fuente de alarma de una posible y reciente contaminación en las aguas de fuentes naturales provenientes debido a que sufrió una contaminación por la presencia de residuos de animales y personas entrando al medio de diferentes métodos como en la lluvia, patas de animales y derretimiento de nieve llegando así la a las fuentes, ríos y aguas subterráneas, sépticas con algún daño fosas. También puede ser el inicio de un indicativo de la presencia de otras bacterias como virus o protozoos que causan enfermedades (Aconsa, 2022).

*Escherichia coli* con su serotipo *O157:H7* es causante de toxinas entre ellas tenemos enterotoxinas, citotoxinas en especial la toxina Shiga o denominada verotoxina son causantes de diarrea sanguinolenta y en algunos de los casos son causantes del síndrome urémico hemolítico daños a los riñones (Vazquez, 2022).

Según la Norma Técnica Ecuatoriana del Instituto Nacional De Normalización NTE INEN permite tener los siguientes requisitos microbiológicos para *E coli* presentada en la tabla 2.

**Tabla 4**

*Requisitos microbiológicos para el agua purificada envasada y el agua purificada mineralizada envasada*

<b>Requisito.</b>	<b>Unidad.</b>	<b>Caso.</b>	<b>n,m</b>	<b>c, %</b>	<b>m,lim</b>	<b>M</b>	<b>Metodo de estudio.</b>
Recuento de Aerobios	UFC/mL	2 <sup>b</sup>	5	2	25	10 <sup>2</sup>	NTE INEN-ISO 4833
Mesófilos							
<i>E. Coli</i>	UFC/100 mL	10 <sup>a</sup>	5	0	0	--	NTE INEN-ISO 9308-1
<i>Pseudomonas Aeuroginosa</i>	UFC/100 mL	10 <sup>a</sup>	5	0	0	--	NTE INEN-ISO 16266

<sup>a</sup> Caso, <sup>10</sup>, peligro incapacitante, pero no amenaza la vida y la salud, las secuelas son raras duración moderada ICMSF 8.

<sup>b</sup> Caso 2, Utilidad; Contaminación general, menos tiempo de vida útil, deterioro inicial.

**n.** Es el número de muestras a Estudiar.

**m** es el límite de aceptación.

**M** es el límite resaltado el cual no se acepta.

**c** es el porcentaje de muestras admisibles dando resultados entre m y M.

**Fuente:** NTE INEN 2200 (2017).

### *Listeria*

**Tabla 5**

*Taxonomía de Listeria monocytogenes*

<b>Taxonomía</b>	
Dominio	Bacteria
Genero	<i>Listeria</i>
Familia	<i>Listeriaceae</i>
Orden	<i>Bacillales</i>
Clase	<i>Bacilli</i>
Filo	<i>Firmicutes</i>

*Fuente:* Tomado de: Fernández (2018).

La especie de *Listeria* pertenece a la familia de *Listeriaceae* misma que se encuentra dentro del tipo de *Bacilli* y una subdivisión que corresponde a *Firmicutes* considerándose la especie de *Listeria monocytogenes* un patógeno de riesgo alto para el ser humano (Gonzalez, 2017)

Es un microorganismo que se encuentra en el ambiente como suelo agua, desechos fecales, gramíneas, ganado y plantas pudiendo llegar por esas fuentes especialmente a animales y personas causando listeriosis. *L.monocytogenes* es virulenta por su resistencia logrando soportar diferentes ambientes por su característica de formar estructuras para protegerse denominados biofilms soportando así desinfectantes y agentes de grado antimicrobiano (Elika, 2021).

**Tabla 6**

*Taxonomía Salmonella*

<b>Taxonomía</b>	
Reino	<i>Bacteria</i>
Genero	<i>Salmonella.</i>
Familia	<i>Enterobacteriaceae</i>
Orden	<i>Enterobacteriales</i>
Clase	<i>Gammaproteobacteria</i>
Filo	<i>Proteobacteria</i>

*Fuente: Tomado de Acosta, Rosarez (2019).*

Se transmite a través del agua por medio de contaminación de residuos ya sean de animales salvajes, ganado, porcinos, aves o aguas residuales. La especie *Salmonella* es de genero gramnegativo perteneciente a la familia *enterobacteriaceae* siendo resistente y sobreviviendo durante mucho tiempo en agua y semanas en ambientes secos (OMS , 2018).Es una bacteria que puede estar presente en alimentos y en aguas contaminadas afectando drásticamente el intestino, siendo la causante de la fiebre tifoidea por el consumo del líquido vital en malas condiciones y Salmonelosis por comer carnes contaminadas causando especialmente efectos nocivos en el organismo como diarrea, fiebre náuseas y vómitos durando varios días (CDC, 2022)

## **Figura 8**

*Contaminación por Salmonella.*



*Nota:* Tomado de Juárez (2020).

### **2.3. Tipos de cultivo**

Los procedimientos de cultivo de microorganismos ayudan verificar y a obtener de manera intencional los patógenos que se desea obtener mismos que se encuentran presentes en los diferentes alimentos y agua. Cuando un cultivo tiene una sola especie de microorganismo de nombra como cultivo puro Oaxénico y si posee diversas especies se denomina cultivo mixto.

#### **2.3.1. Cultivo puro oxénico**

Este procedimiento está enfocado en obtener una sola especie microbiana el cual proviene de una sola célula obteniéndose en un laboratorio artificialmente teniendo las debidas precauciones asépticas al momento de manejar el procedimiento como ejemplo está el uso de medios selectivos para el crecimiento de un determinado microorganismo (S.A.S, 2022).

#### **2.3.2. Cultivo mixto**

En un cultivo mixto se desarrollan y viven diferentes especies de microorganismos de forma conjunta.

### **2.4. Técnicas de cultivo en placa**

#### **2.4.1. Técnica por estría en superficie**

Se deposita el material en la superficie del agar extendiéndolo por la placa con un asa esterilizada.

## Figura 9

*Cultivo por estría en superficie.*



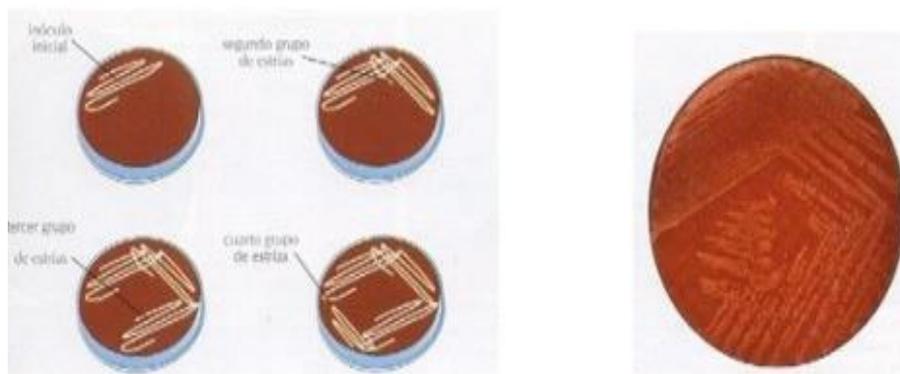
*Nota:* Tomado de Miranda (2017).

### 2.4.2. Técnica de siembra para aislamiento por estría múltiple.

Con un asa esterilizada se toma una muestra de cultivo y se extiende por un área pequeña de la superficie de la placa que contiene agar, realizando estrías muy juntas y sin hacer mucha presión para evitar daños en el agar flameando nuevamente el asa y extendiéndolo la muestra nuevamente por otra zona de la placa realizando nuevas estrías teniendo en cuenta que el último tramo para la siembra se lo realizara hacia el interior y se lo incubara siempre en posición invertida.

## Figura 10

*Aislamiento por estría múltiple.*



*Nota:* Tomado de Taleno (2020).

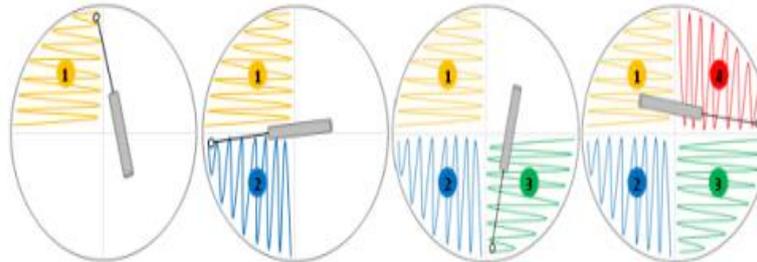
### 2.4.3. Técnica de cuatro cuadrantes.

Se divide la placa en cuatro cuadrantes con un rotulador, se ponen los números y se procede con el asa esterilizada a realizar la siembra en forma de estría con la muestra en el agar nutritivo iniciando con el cuadrante 1 hasta llegar al cuatro teniendo como objeto

que al menos en uno de los cuatro cuadrantes se encuentren bacterias aisladas (NEUQUEN, 2021).

### Figura 11

*Cultivo mediante cuatro cuadrantes.*



*Nota:* Tomado de Neuquen (2021).

#### 2.4.4. Técnica por agotamiento o en superficie.

Con el asa previamente esterilizada se procede a depositar una sola muestra en el agar extendiéndolo de forma de estría por toda la placa teniendo como objeto que a partir de un número elevado de microorganismos por el método de la estría se obtiene un número reducido de bacterias distribuidas individualmente en la superficie del agar (JFLAbclinico, 2022).

### Figura 12

*Siembra por agotamiento en superficie*



*Nota:* Tomado de JFLAbclinico (2022).

#### 2.4.5. Técnica de siembra masiva.

Esta técnica es recomendable por lo que permite obtener un elevado número de microorganismos en un medio de cultivo empleando un hisopo estéril el cual se pasa por la superficie del agar nutritivo de una placa en diferentes direcciones y para finalizar se lo realiza por los bordes para así garantizar el desarrollo total de los microorganismos (NEUQUEN, 2021).

### **Figura 13**

*Siembra masiva en placa.*



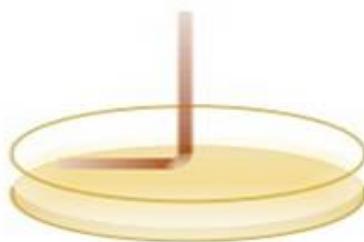
*Nota:* Tomado de Miranda (2020).

#### **2.4.6. Técnica de siembra por punción.**

Es utilizado para la observación del crecimiento de los microorganismos y con el tiempo se estudiará su morfología o así mismo para el subcultivo de cepas que fueron almacenadas y conservadas en el cual con el uso de una asa micológica o asa recta se toma parte de la muestra y con una punción leve en el centro del agar, pero sin tocar el fondo de la caja Petri se deja inocular el microorganismo que se estudiara (Reynoso & Magnoli, 2022).

### **Figura 14**

*Siembra por punción en placa.*



*Nota:* Tomado de Baixar (2016).

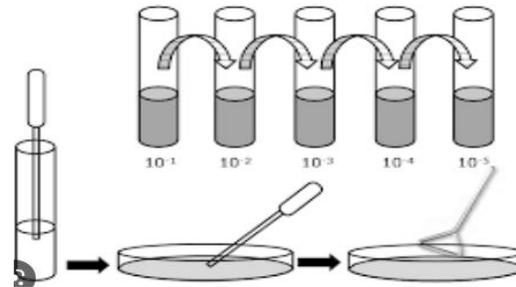
#### **2.4.7. Técnica de siembra por dilución**

Se inicia con la muestra inicial del cual se desea estudiar y los tubos de ensayo con el porcentaje exacto de agua estéril que es solvente para la dilución empezando con la adición de una cantidad exacta de la muestra para dilución en el tubo inicial y se agita en un vibrador para su respectiva homogenización, y con una pipeta estéril se toma la cantidad específica del primer tubo y se deposita en el segundo se homogeniza y se repite el caso dependiendo la dilución esperada realizado todo este procedimiento con la

dilución final se inocula un porcentaje exacto en las placas de cultivo con la ayuda de una asa digrasky se distribuye en la placa para su cultivo y se incuba dependiendo la temperatura y el tiempo para el microorganismo a estudiar (German, 2022).

### Figura 15

*Siembra por dilución*



*Nota:* Tomado de Barros (2022).

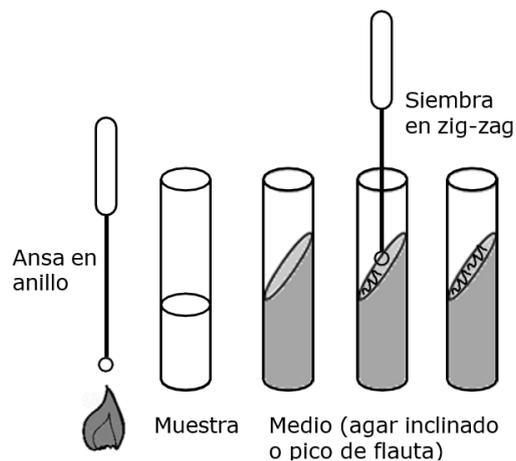
## 2.5. Técnicas de siembra para tubos.

### 2.5.1. Siembra en tubos por estría simple.

Esta técnica se realiza en un tubo con un medio agar sólido inclinado en bisel y se desliza el asa en la superficie de manera que se hagan en forma de surcos o estrías (Quenta, 2020).

### Figura 16

*Siembra en tubos por estría simple.*



*Nota:* Tomado de Barros (2022).

### 2.5.2. Siembra en tubos por picadura.

Esta técnica se realiza en un tubo con medios sólidos y semisólidos sin inclinar con el asa recta; en el cual con el asa esterilizada ya con la muestra se introduce el

microorganismo al medio por el centro de la superficie del tubo hasta llegar al fondo del tubo evitando tocar las paredes.

### **Figura 17**

*Siembra por picadura en tubo.*



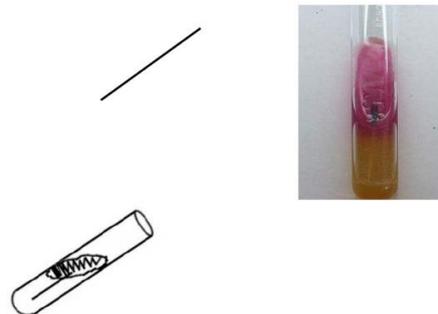
*Nota:* Tomado de Taleno (2020).

### **2.5.3. Siembra mixta en tubos**

Esta técnica se realiza en tubos con medios sólidos o semisólidos inclinados o bisel, realizando una picadura con el asa ya con la muestra por el centro de la superficie hasta llegar al fondo del tubo y la otra siembra se lo realiza en la superficie en forma de estrías o surcos realizando así dos siembras (Barrera, 2019).

### **Figura 18**

*Siembra por picadura y estría.*



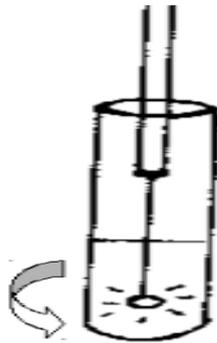
*Nota:* Tomado de Barrera (2019).

### **2.5.4. Siembra por inoculación o agitación.**

Con el uso de un asa previamente esterilizada se toma la cantidad de la muestra a estudiar se introduce en el centro del medio de cultivo líquido agitándose con dos o tres movimientos de manera circular y tratando de no tocar las paredes del tubo, se retira el asa del tubo y se lo esteriliza para eliminar los microorganismos que hayan quedado adheridos al asa. (Reynoso, 2022).

## Figura 19

*Siembra por agitación.*



*Nota:* Tomado de Barrera (2019).

## 2.6. Tipos de medio de cultivo según su función.

### 2.6.1. Medio general

Se caracteriza por lo que en este medio pueden crecer todo tipo de microorganismo que se desea estudiar.

### 2.6.2. Medio selectivo.

Se caracteriza por contener algunos nutrientes específicos y su función principal en este medio es que crezcan un solo tipo específico microorganismos por ejemplo si se desea aislar *Salmonella* se puede utilizar este medio para inhibir el crecimiento de otros microorganismos (Beltran, 2022).

### 2.6.3. Medio diferencial

Este medio de cultivo permite la diferenciación e identificación de una especie de otra en el mismo medio de cultivo dependiendo el tipo de metabolismo que los microorganismos contengan llevando un indicador que permite observar la diferenciación del mismo (Viresa, 2021).

### 2.6.4. Medio de enriquecimiento o nutritivo.

Posee los nutrientes necesarios para que puedan crecer diferentes especies de microorganismos consiguiendo que en este medio se logre la proliferación máxima de las diferentes especies entrando extractos especialmente de carne, sangre y levaduras con peptonas en lo cual no contiene agentes inhibidores dando lugar así para que crezcan diferentes especies incluyendo microorganismos exigentes (Gil, 2019).

### **2.6.5. Medio mínimo.**

Este medio nutritivo contiene la cantidad mínima de nutrientes los cuales son indispensables para que pueda crecer una especie determinada de microorganismos sin la presencia de aminoácidos o manteniendo muy pocos (Arumi, 2022).

### **2.7. Tipos de agar**

Son medios de cultivo que contienen un conjunto de nutrientes que ayudan a tener condiciones adecuadas y necesarias para el desarrollo de los diferentes microorganismos que se desea estudiar de los cuales los más utilizados son:

#### **2.7.1. Agar/Caldo LB (Luria Bertani) o Agar caldo Millers LB.**

Este agar es un tipo de medio de cultivo nutritivo que no es selectivo ni diferencial, posee triptona, extractos de levadura y cloruro de sodio NaCl, contiene los nutrientes necesarios para el crecimiento de la materia de microorganismos (Rovira, 2022).

#### **2.7.2. Agar sangre.**

Este tipo de agar es un medio diferencial enriquecido conteniendo la combinación de un agar de sangre de animales mamíferos como oveja, conejo o en ocasiones humanos con un nivel de concentración de 5-10%; utilizándose para el aislamiento de microorganismos como *Streptococcus* dentro de estos *S. pyogenes* y *S. aureus*. Por lo cual es diferencial para detectar actividad hemolítica (lisis y digestión de eritrocitos) las bacterias pueden hacer B-hemolisis que es una lisis completa y se podrá apreciar un halo incoloro al contorno de la colonia o una  $\alpha$ -hemolisis (hemolisis parcial) apareciendo un halo de colores verdosos alrededor de la colonia (Monteiro, 2019).

#### **2.7.3. Agar chocolate**

Este tipo de medio es un agar de sangre que se ha realizado un método de calor para que los glóbulos rojos cambien a color marrón dando así una coloración a chocolate. Se emplea para el aislamiento de *Haemophilus influenzae* y *Neisseria meningitis*, al momento de la incubación se liberan glóbulos rojos que son necesarios para el crecimiento de los microorganismos (Ñuñoa, 2018).

#### **2.7.4. Agar MacConkey**

Este agar es un medio diferencial y selectivo creciendo bacterias gram negativas como aerobias y anaerobias facultativas incluyendo a todo el género *Enterobacteriaceae*,

Inhibiendo el crecimiento de bacterias gram positivas por lo que contiene sales biliares y cristal violeta. Este medio es diferencial porque ayuda a detectar bacterias que fermentan la lactosa como (*Escherichia coli, klebsiella*) acidificando el medio y que las colonias y el medio tomen un color característico rosado o rojizo, en el caso de que exista presencia de (*Salmonella, Proteus, Yersenia*) no habrá un cambio de color por lo que estas especies no degradan la lactosa (Prieto, 2022).

#### **2.7.5. Agar sabouraud**

Este medio agar es empleado para el cultivo de hongos por lo que contiene una alta concentración de dextrosa y con un pH bajo logrando con esto la inhibición de la mayoría de las bacterias y también posee gentamicina que es un antibiótico que impide el desarrollo de bacterias gram negativas (Poincare, 2019).

#### **2.7.6. Agar entérico de hektoen.**

Este agar es un medio diferencial y selectivo especialmente para bacterias gram negativas como *Salmonella* y *Shigella* debido a que posee un indicador de pH en el cual las bacterias que acidifican el medio de cultivo hacen que el agar se toné de color amarillo o rojo y los microorganismos que lo alcalinizan el agar lo vuelven de color azul, permitiendo así la diferenciación de bacterias por la presencia de Tiosulfato como es en el caso para *Salmonella* que se forman colonias de color negro por la producción de ácido sulfúrico (Rossy, 2021).

#### **2.7.7. Agar Müller -Hinton.**

Este agar es un medio no selectivo con extractos de triptona, almidones carne e infusiones permitiendo el crecimiento de la mayoría de microorganismos, utilizándolo para pruebas con antibióticos y antimicrobianos debido a que la formula del agar no se encuentra tan concentrada permitiendo así la difusión de los antimicrobianos (Britania, 2021).

#### **2.7.8. Agar Xilosa -Lisina-Desoxicolato (XLD).**

Este medio de cultivo es de tipo selectivo y diferencial para *Salmonella, Shingella* el cual es adecuado para el aislamiento de estos microorganismos de categoría Gram negativos que son tolerantes a las sales biliares, teniendo así un color característico rojo fenol ayudando a diferenciar las colonias de color rosa pálido. Además, contiene citrato de hierro y amonio el cual permite que se pueda esperar los microorganismos productores de ácido sulfhídrico como son colonias con centros de color negro (Valdes, 2021).

### **2.7.9. Agar verde brillante**

Este medio de cultivo es de tipo selectivo y es utilizado especialmente para el aislamiento de *Salmonella* a excepción de *Salmonella typhi* y *S paratyphi*. El característico color actúa como un agente selectivo que inhibe el crecimiento de microorganismos Gram positivos y así mismo de algunos Gram negativos, los principales hidratos de carbono que ayudan a fermentar son la lactosa y la sacarosa y el rojo fenol es el que indica el pH que cambia a color amarillo cuando existe una producción del ácido sulfhídrico cuando los azúcares se fermentan (Rossi, 2021).

### **2.7.10. Agar triptona -soja (TSA)**

Este medio agar es producido por la digestión enzimática de soja y caseína es de uso general y está enfocado especialmente para el crecimiento de una amplia variedad de especies incluidas dentro de microorganismos aerobios y anaerobios, se lo puede utilizar en una caja Petri ya sea líquido o sólido teniendo una función variada como es en la obtención de cultivos puros o con medios de enriquecimiento para obtener más cantidad o así mismo se lo utiliza para el estudio de las morfologías de las colonias, creciendo en este medio microorganismos de especies alarmantes como *Listeria*, *Brucella*, *Corynebacterium*, *Neisseria* y *Vibrio* (Winkler, 2020).

### **2.7.11. Listeria agar cromogénico**

Este medio de cultivo es preparado con suplementos selectivos y diferenciales como son peptona de carne y triptona así mismo contiene cloruro de litio, polinixina, ácido nalidixico y anfotericina esta actúa inhibiendo los demás microorganismos, utilizándose especialmente para el aislamiento e identificación de la especie que se encuentran presentes en diferentes alimentos para consumo. La beta-glucosidasa es la enzima que se encuentra presente en las especies de *Listeria* y mediante reacciones, combinaciones enzimáticas cromogénicas y de fosfolipasa se puede apreciar en un cultivo las dos especies como *Listeria monocytogenes* que son colonias azules rodeadas por un halo opaco y *Listeria spp* se diferencia por contener sus colonias de color azul sin halo opaco (ThermoFisher, 2021).

## CAPITULO III

### 3. MARCO METODOLÓGICO

#### 3.1.1 Localización de la investigación

Este proyecto investigativo se llevó a cabo en la Universidad Estatal de Bolívar, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Recursos Naturales y del Ambiente, Carrera de Agroindustrias, instalaciones del Departamento de Investigación Laguacoto II.

**Tabla. 7**

*Aspectos generales del territorio*

<b>Parámetro</b>	<b>Valor</b>
Altitud	2.630 msnm
Latitud	01°36'52"S
Longitud	78°59'54"W
Temperatura máxima	21°C
Temperatura mínima	7°C
Temperatura media	14,4°C
Precipitación media	980 mns
Heliofanía(H/L) /año	100
Humedad relativa	70%
Velocidad promedio del viento	6 m/s

**Fuente:** Puga (2021).

#### 3.1.2. Situación geográfica y climática.

**Tabla 8**

*Datos de la situación climática y geográfica.*

<b>Parámetro</b>	<b>Valor</b>
Altitud	2.622 msnm
Latitud	01°36'15"S
Longitud	78°59'54"W
Temperatura mínima	7°C
Temperatura media anual	14.4°C
Temperatura máxima	21°C
Humedad Relativa promedio	75%
Precipitación media anual	980 mm
Heliofanía promedio	900/horas/luz/año

**Nota:** Estación Meteorológica Laguacoto II. UEB (2021).

### **3.1.3. Zona de vida**

El lugar donde se lleva a cabo la investigación corresponde a una zona de vida denominada bosque húmedo montano bajo (BHMB). Según lo propone y lo clasifica el botánico climatólogo L. Holdridge.

## **3.2. Materiales**

### **3.2.1. Material experimental.**

1 muestra de agua embotellada de una unidad de 1000 mL de las 16 empresas procesadoras de agua para consumo que comercializan el producto la Provincia Bolívar.

### **3.2.2. Materiales de oficina.**

- Esferos
- Lápices
- Borrador
- Hojas papel bond A4
- Calculadora
- Computadora portátil
- Carpetas
- Cuaderno para apuntes
- Portafolio
- Memoria Flash

### **3.2.3. Materiales de Laboratorio.**

- Botellas de vidrio.
- Mechero bunsen
- Estrías para siembra
- Placas Petri
- Agares para cultivos
- Bomba eléctrica para membrana
- Pipetas
- Micropipetas y material de aspiración
- Fundas herméticas
- Tubos de ensayo

- Probeta
- Vasos de precipitación
- Guantes
- Alcohol
- Algodón
- Gradillas
- Tubos de ensayo
- pH metro
- tubos Durham
- Microtubos eppendorf
- Gradillas eppendorf
- Portaobjetos
- Beaker de 250 mL

### **3.2.3. Equipos**

- Incubadoras
- Balanza digital
- Agitador vortex
- Termómetro
- Termociclador PCR.
- Transiluminador
- Cuba hidroneumática
- Espectrofotómetro

### **Reactivos para tinción de gram**

- Violeta de genciana
- Lugol
- Alcohol al 70%
- Acetona
- Tinción de safranina o fucsina
- Aceite de inmersión

### **Reactivos para Reacción De Cadena Polimerasa (PCR).**

- GoTaq Green Master Mix, 2x.

- Agua libre de nucleasas
- Cebadores o primers forwar y reverse.
- Kit de extracción ADN.

### 3.3. Métodos

#### 3.3.1. Factores en estudio

De acuerdo a las particularidades de la investigación propuesta se plantea desarrollar los siguientes factores para los cuales se definen a continuación:

**Factor A:** Localidades

**Factor B:** Método de análisis

**Tabla 9**

*Factores de estudio*

Factor	Código	Niveles
Localidades	<b>A</b>	a <sub>1</sub> : Chimbo
		a <sub>2</sub> : Guaranda
		a <sub>3</sub> : San Miguel
		a <sub>4</sub> : Caluma
		a <sub>5</sub> : Chillanes
Método de análisis	<b>B</b>	b <sub>1</sub> : Análisis Biomolecular PCR b <sub>2</sub> : Cultivos

*Nota:* Trabajo experimental.

#### 3.3.2. Tratamientos

Los tratamientos son derivados de los factores de estudio utilizándose estos como referencia para el desarrollo de la investigación detallándose en la siguiente tabla:

**Tabla 10***Tratamientos*

Tratamientos	Código	Tratamientos	
		A	B
1	a1b1	Chimbo	Análisis Biomolecular
2	a1b2	Chimbo	Cultivos
3	a2b1	Guaranda	Análisis Biomolecular
4	a2b2	Guaranda	Cultivos
5	a3b1	San miguel	Análisis Biomolecular
6	a3b2	San miguel	Cultivos
7	a4b1	Caluma	Análisis Biomolecular
8	a4b2	Caluma	Cultivos
9	a5b1	Chillanes	Análisis Biomolecular
10	a5b2	Chillanes	Cultivos

*Nota:* Trabajo experimental.**3.3.3. Características del experimento.**

Correspondió a la siguiente tabla informativa:

**Tabla 11***Características del diseño*

Atributos Del Diseño Factorial	
Numero de factores experimentales (Fe)	2
Numero de tratamientos (t)	11
Numero de repeticiones (r)	3
Número de unidades experimentales (txr)	33
Tamaño de unidad experimental.	1000 mL

*Nota:* Trabajo experimental.**3.3.4. Tipo diseño experimental o estadístico.**

Se aplicará un diseño completamente al azar (DCA) con arreglo factorial A x B (5 x2) con tres repeticiones. Así mismo se aplicará un análisis de varianza (ANOVA) para

establecer las diferencias entre los tratamientos el cual está reflejado en el siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + (AB)_{ij} + E_{ijk}.$$

**Donde:**

**Y<sub>ijk</sub>:** Variable sujeta a medición

**μ:** Representa la media global

**A<sub>i</sub>:** Es el efecto del factor A

**B<sub>j</sub>:** Efecto del factor B

**(AB)<sub>ij</sub>:** Efecto de la interacción A x B

**E<sub>ijk</sub>:** Efecto Del Error Experimental Aleatorio.

**Tabla 12**

*Modelo de Análisis de varianza ANOVA.*

<b>F.de</b>	<b>S.</b>	<b>Grados de</b>	<b>Cuadrado</b>	<b>F<sub>exp</sub></b>	<b>Valor de P</b>
<b>Viabilidad</b>	<b>Cuadrados</b>	<b>libertad</b>	<b>medio</b>		
Factor A	SC <sub>A</sub>	a-1	CM <sub>A</sub>	CM <sub>A</sub> /CM <sub>E</sub>	P(F>F <sub>0</sub> <sup>A</sup> )
Factor B	SC <sub>B</sub>	b-1	CM <sub>B</sub>	CM <sub>B</sub> /CM <sub>E</sub>	P(F>F <sub>0</sub> <sup>B</sup> )
Factor AB	SC <sub>AB</sub>	(a-1) (b-1)	CM <sub>AB</sub>	CM <sub>AB</sub> /CM <sub>E</sub>	P(F>F <sub>0</sub> <sup>AB</sup> )
Error	SC <sub>E</sub>	ab(n-1)	CM <sub>E</sub>		
Total	SC <sub>r</sub>	abn1			

*Nota:* Tomado de Gutiérrez (2008).

### 3.4. Métodos de evaluación y datos a tomarse.

#### 3.4.1. Variable de respuesta.

- **Concentración de bacterias**

Se lo hace para evaluar el estado del agua embotellada verificando así la presencia o ausencia de bacterias como *E. Coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. garantizando así la eficacia del proceso de tratamiento de las aguas destinadas al consumo humano e indicando así el nivel limpieza y el estado de los sistemas de distribución basándonos bajo la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 2200 2017.

### **3.5. Georreferenciación**

Este método permite expresar la posición exacta o relativa de un punto en la superficie de la tierra en lo cual consiste en la localización geográfica mediante coordenadas específicas ubicando los lugares y direcciones exactas dentro de un mapa digital con el objeto de identificar cada una de las procesadoras de agua embotellada que se encuentran en la provincia Bolívar para lo cual el método a utilizar para tener una muy buena precisión será de un **GPS** el mismo que permitirá dar los puntos exactos de los lugares.

Al realizar la Georreferenciación se logrará:

- Conocer las coberturas geográficas en donde se encuentran las empresas expendedoras.
- Entender las ubicaciones con coordenadas y referencias del lugar donde realmente se encuentran las empresas.

#### **3.5.1. Recolección de datos**

Mediante la recolección de datos se asegurará que la información sea confiable de cada una de las muestras analizadas según los resultados de los análisis cuantitativos obtenidos haciéndola de manera precisa con exactitud para así evitar errores para lo cual se utilizará el Software Excel.

### **3.6. Manejo del experimento.**

#### **3.6.1. Obtención De Muestras.**

Para evitar confusiones en el manejo de esta investigación se lo realizo bajo reglas específicas detallándose a continuación:

Las muestras de agua se obtuvieron en las diferentes empresas procesadoras de agua embotellada de la provincia Bolívar encontrándose en Caluma, San Miguel, Guaranda, Chimbo, Chillanes y Echeandía para luego ser trasladadas al departamento de investigación de la Universidad Estatal de Bolívar donde se realizará los respectivos análisis propuestos por esta investigación.

#### **3.6.2. Codificación e identificación de las muestras**

Las 17 muestras agua embotellada a analizar se codificarán para poder identificarlas como la fecha que se visitó la planta para el muestreo y de acuerdo a la marca nombre de la empresa y lugar para un mejor manejo de cada una de ellas. Especificándose de la siguiente manera marca, número, fecha y localidad para identificar la muestra.

### 3.6.3. Registro de las muestras.

Una vez tomada las muestras en las plantas procesadoras de agua embotellada se procederá el registro de las muestras colocando etiquetas para el rotulado en los envases tomando como base principal la Norma Técnica Ecuatoriana **INEN 2176:1998** catalogada como calidad de agua y técnicas de muestro en la cual menciona que deben incluirse por lo menos los datos siguientes para el informe de muestreo:

- Localización y nombre del lugar de muestreo.
- Detalles del punto de muestro fecha de la recolección.
- Método de recolección.
- Hora de recolección.
- Nombre del recolector.
- Condiciones atmosféricas.
- Naturaleza del pretratamiento.
- Preservante o estabilizador adicionado.
- Datos recogidos en el lugar.

**Tabla 13**

*Codificación, identificación registro de las muestras y origen.*

<b>Código</b>	<b>Origen, Cantón</b>	<b>Cantón</b>	<b>Lugar de procedencia</b>	<b>Hora</b>
T1	San Miguel	1000 mL	Av. Veintimilla y 10 de enero	9:00 am
T2	Guaranda	1000 mL	Santa Fe a una cuadra del centro AYA UMA	3:15 pm
T3	Guaranda	1000 mL	Guanujo; 4 Esquinas	12:32 pm
T4	Guaranda	1000 mL	Julio Moreno Recinto Cashapamba	10:14 pm
T5	Guaranda	1000 mL	Simiatug	13:24 pm
T6	Guaranda	1000 mL	Alpachaca Sector UEB	2:30 pm
T7	Chimbo	1000 mL	Tamban ciud. Santa Marianita	10:14 pm

T8	Caluma	1000 mL	Vía Montalvo- Recinto Tablas De La Florida	2:00 pm
T9	Caluma	1000 mL	Caluma vía Guaranda a 100 metros de hostería Madera fina	11:12 am
T10	Caluma	1000 mL	Rec. La Alsacia vía el santuario de la virgen.	10:30 am
T11	Caluma	1000 mL	Calle: Anarcis Camacho 1091 Av. La naranja	12:23 pm
T12	Caluma	1000 mL	Vía a Charquiyacu Recinto san Vicente	11:00 am
T13	Caluma	1000 mL	La Fortuna S/N Vía A La Esmeralda, Cerca El Complejo Deportivo La Roca	1:05 pm
T14	Chillanes, San José del Tambo	1000 mL	San José del Tambo (Tambopamba), vía San Vicente	10:30 am
T15	Chillanes, San José del Tambo	1000 mL	Recinto la Colombia, junto al subcentro de salud	11:29 am
T16	Chillanes, San José del Tambo	1000 mL	Recinto Nuevo Porvenir	2:15 am
T17	Chillanes	1000 mL	Quilayaco Calle: Continuación Regulo De Mora	10:10 am

T18	Chillanes San José del Tambo	1000 mL	Frente a la escuela Colombia Alta	2:30 pm
19	Caluma	1000 mL	Vía al valle	2:50 pm

---

**Nota:** Trabajo experimental.

### 3.9. Análisis Microbiológicos

#### 3.9.1. Aislamiento de *E. Coli*

Se preparo el agar Mac Conkey para determinar si existe la presencia *E. Coli* en las aguas embotelladas. Este agar está compuesto por sales biliares y cristal violeta que impiden el crecimiento de patógenos Gram positivos a si mismo contiene lactosa y el indicador de pH rojo neutro que permiten la apreciación de los microorganismos.

Para lo cual, en su preparación se pesó 12 gramos de agar y se depositó en 255 mL de agua destilada y se homogenizo hasta que la mezcla este completamente hecha posteriormente se dejó reposar durante 10 minutos, luego se depositó en un envase de laboratorio con imanes giratorios para poner en una plancha de agitación con calentamiento para que se disuelva por completo el agar hasta el punto de ebullición iniciando en número 4, y se lo deja reposar hasta una temperatura de 40°C , seguidamente se incorpora en las placas petri y se deja enfriar. Posteriormente se trabajó mediante el método filtración por membrana bajo la **Norma Técnica Ecuatoriana INEN-ISO 9308-1** en lo cual, de las 11 muestras de agua embotellada se extrajo 100 mililitros de cada una de ellas previamente puestas las membranas (CHM, MPV045047H, España) se depositó en el embudo Buchner de la rampa de succión para filtración y se filtra. Posteriormente se retiran cuidadosamente las membranas con el uso de pinzas y se depositara en las cajas petri previamente rotuladas con el medio de cultivo para cada una de las muestras, y se lo procede a encubar a las temperaturas de acuerdo a las condiciones de cultivo. Luego de ser incubados bajo aerobiosis las colonias características de *Escherichia Coli* fermentaron la lactosa dando características de colonias rosas o

rojizas para confirmar se inoculo en el medio Bilis Verde Brillante en lo cual se utilizó el método de la Norma Técnica Ecuatoriana **INEN 1529-6** en lo cual se dejó incubar a 37.5°C por un periodo de 24 horas en caso de que salga negativo se incubara durante 24 horas más y luego se determina y analizara mediante la tinción de Gram.

### **3.9.2. Aislamiento de *Listeria*.**

Para determinar si existía la presencia *Listeria* en las aguas embotelladas se utilizó **Aloa *Listeria*, Agar Base** (ISO 9001-1:2015.) Este medio está compuesto por peptona de carne encontrándose dentro de estas los nutrientes necesarios para el desarrollo así mismo contiene extractos de levadura la cual genera la vitamina B. El piruvato sódico actúa como fuente de energía la cual ayuda a verificar al patógeno. El Ácido Nalidixico, Polimixina, Cloruro De Litio, Cicloheximida y Deftazidima ayudan a que el medio sea selectivo. Este sustrato detecta la enzima *B-glucosidasa* la cual está presente en los géneros de *Listeria* colorando sus colonias de azul. El sustrato de Lipasa es la aureola de un color característico blanco opaco que este alrededor de la listeria azul (ISO 11290-1:2004, 2012).

Para su preparación se pesó 18 gramos de **Aloa *Listeria*, Agar Base (L. Mono diferencial Agar Base)** se depositó en 255 mL de agua destilada y se homogenizo hasta que la mezcla este completamente hecha posteriormente se traslada a la plancha de agitación con calentamiento para que se disuelva por completo el agar hasta el punto de ebullición iniciando en número 4, luego se lo llevo al autoclave a 121°C durante 15 min y se lo deja bajar hasta una temperatura de 45 a 50°C. Seguidamente se incorpora se en las placas petri y se deja enfriar. Seguidamente se trabajó mediante el método filtración por membrana bajo la **Norma Técnica Ecuatoriana INEN-ISO 9308-1** en lo cual de las 11 muestras de agua embotellada se extrajo 100 mililitros de cada una de ellas previamente puestas las membranas (**CHM, MPV045047H, España**) y se depositó en el embudo Buchner de la rampa de succión para filtración y se filtra. Posteriormente se retiran cuidadosamente las membranas con el uso de pinzas estériles y se depositara en las cajas Petri, con el medio de cultivo previamente rotulada para cada

una de las muestras. Se lo procede a encubar a las temperaturas de acuerdo a las condiciones de cultivo. Luego de ser incubados bajo aerobiosis las colonias características de *Listeria* fueron cultivadas en agar cromogénico en lo cual se utilizó el método de la norma **ISO 11290-1** para *Listeria* en lo cual se dejó incubar a 37. °C por un periodo de 24 horas en caso de que salga negativo se incubara durante  $\pm 24$  horas más y luego se determina y analizara mediante la tinción de Gram.

### **3.9.3. Aislamiento de *Salmonella***

Para la determinación de *Salmonella* spp. se preparó el agar XLD (*Xilosa Lisina Desoxicolato*) para determinar si existe la presencia *Salmonella* en las aguas embotelladas. Este agar está compuesto con el extracto de levadura es la principal fuente de nutrientes para los microorganismos que crecen en este agar proporcionando energía las bacterias que se desarrollan en el mismo. Para inhibir el crecimiento de bacterias gran positivas este medio contiene desoxicolato sódico. Así mismo contiene lisina la cual ayuda a la diferenciación de la *Salmonella* spp.

Para su preparación se pesó 14 gramos de medio XLD deshidratado y se depositó en 255 mL de agua destilada y se homogenizo hasta que la mezcla este completamente hecha posteriormente se dejó reposar 10 minutos luego se depositó en una botella de laboratorio imanes giratorios para poner en una plancha de agitación con calentamiento para que se disuelva por completo el agar hasta el punto de ebullición iniciando en número 4, y se lo deja reposar hasta una temperatura de 40° en baño maría seguidamente se incorpora se en las placas petri y se deja enfriar. se prepara las 11 muestras para trabajar mediante el método filtración por membrana bajo la **Norma Técnica Ecuatoriana ISO 19250:2013** en lo cual de las 11 muestras de agua embotellada se extrajo 100 mililitros de cada una de ellas previamente puestas las membranas (CHM, MPV045047H, España) se depositó en el embudo Buchner en la rampa de succión para filtración y se los filtra. Según el método utilizado por (Nuñez & Bayas, 2020) , se retiran cuidadosamente las membranas con el uso de pinzas estériles y se depositara en las cajas petri previamente rotuladas con los medios de cultivo y se lo procede a encubar a las

temperaturas de acuerdo a las condiciones de cultivo. Luego de ser incubados bajo aerobiosis las colonias características de *Salmonella* que fueron de color negro y una parte transparente de color rojizo dependiendo el serotipo, fueron cultivadas nuevamente en el medio XLD en lo cual se utilizó el método de la Norma Técnica Ecuatoriana **INEN-ISO 6579 enmienda** dejando incubar a 41.5°C por un periodo de 24 horas en el caso de que no exista presencia se dejara incubar durante 24 horas más, para posteriormente analizarlas mediante tinción de gram.

#### **3.9.4. Tinción de Gram.**

Mediante esta técnica microscópica se permitió observar la coloración y presencia tanto de los microorganismos presentes ya sean estos gram positivos como es *Listeria* que se tornaran de color azul y gramnegativos como *E. coli* y *Salmonella* que se tornaran de color rosa. Mediante el proceso de la morfología celular luego de la confirmación microscópica los aislados serán conservados en crioviales con glicerol al 10% y caldo nutritivo para que sean congelados a -20°C para su análisis molecular.

#### **3.10. Análisis Molecular (PCR) Reacción en cadena de la polimerasa.**

Para el análisis molecular se aplicó la metodología de PCR convencional. En lo cual de los aislados de las muestras de agua embotellada conseguidos de los tres microorganismos de estudio se les extrajo su ADN mediante el método de aislamiento de ADN específico (**Invitrogen Thermo Scientific Genomic DNA mini Kit, k182001, USA**). Siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la reacción de amplificación se utilizó el método de Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional permitiendo así la identificación y detección de estos distintos genes ejecutándose en un volumen de total de 50 µL conteniendo en el mismo 45µL de la mezcla de los reactivos y 5µL del ADN extraído en lo cual se utilizó reactivos como: Primers Forward y Reverse (**Invitrogen, 90489462**), Nuclease-Free Water (**Promega, 0000334315, USA**), GoTaq® Green Master Mix, 2X (**Promega, 0000543067, USA**) mismo que posee una mezcla maestra que ya contiene en el mismo, tampón de reacción en concentraciones óptimas, dNTP, ADN polimerasa GoTaq, MgCl<sub>2</sub> y los tintes de color amarillo y azul mismos que permiten monitorear el progreso durante el

proceso de electroforesis. Seguidamente se colocó 45 µL de la solución GoTaq® Green Master Mix ya preparada en un micro tubo eppendorf y se adiciono 5 µL de AND que fueron extraídos de los aislados confirmados, se procede a llevar la solución lista al termociclador (**Biometra TAdvanced**) y se corre los ciclos establecidos en la tabla 14 para la amplificación en PCR de *Listeria*, *Salmonella*, *E. coli*.

Los resultados se analizarán mediante electroforesis horizontal con gel de agarosa (Agarose®) (**Fisher bioagents, BP160-100, USA**) al 2%, preparado con el tampón al 1X, adicionando 4 µL del colorante Nucleic Acid Dye (**Diamond™**) y se someterá a 135 voltios durante un tiempo de 30 minutos para estimar el tamaño de los fragmentos de ADN amplificados con el uso de un marcador de pesos molecular de 100pb (**INBIO HIGHWAYBS.A, K0177**).

El ADN será amplificado mediante PCR convencional (Reacción de Cadena Polimerasa) con el uso de cebadores que amplifican un fragmento del gen 16S ARNr, los iniciadores utilizados fueron descritos por (Meghdadi & Nassirabady, 2019), (Nuñez & Bayas, 2019) y (Gomez & Torres, 2022) cuyas secuencias se detallan a continuación:

**Tabla 14**

*Cebadores específicos utilizados en esta investigación*

<b>Bacteria</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Pares de bases bp</b>	<b>Referencias</b>
<i>Listeria monocytogenes</i>	(R,5'-GCCGTCGATGATTTGAACTTCATC-3') (F,5'-GAATGTAAACTTCGGCGCAATCAG-3')	388 bp	(Meghdadi & Nassirabady, 2019)
<i>Escherichia coli con su serotipo O157:H7</i>	(R,5'-GCTATTTCTGCCGATAAGAGA-3') (F,5'-CCAGGCAAAGAGTTTATGTTGA-3')	212 bp	(Nuñez & Bayas, 2019)

<i>Salmonella spp.</i>	<i>invaA3R</i>	(R,5'-	244 bp	(Gomez &
	TCCATCAAATTAGCGGAGGC-3')			Torres,
	<i>inva3F</i>	(F,5'-		2022)
	AACGTGTTTCCGTCGTAAT-3')			

Se efectuó la reacción de amplificación con un volumen final de 50 µL, contenido 45 µL de la mezcla y 5 µL de ADN. Los reactivos a utilizar en la prueba PCR se representa en la tabla 13 para cada uno de los microorganismos de estudio.

**Tabla 15**

*Reactivos PCR para Listeria monocytogenes, Escherichia coli, Salmonella spp.*

Reactivos	Volumen uni.	<i>Listeria m</i> N° de muestras	<i>E – coli</i> N° de muestras	<i>Salmonella spp.</i> N° de muestras
GoTaq® Green Master Mix, 2X	12.5 µL			
Forwar primer, 10µM	0.25-2.5 µL	18	12	6
River ,10µM	0.25 -2.5µL			
DNA Templade	1-5 µL			
Nuclease-Free	25 µL			
Wáter				
<b>Volumen total</b>		729 /18=40,5 µL	486 /12=40,5 µL	243 /6=40,5 µL

**Tabla 16**

*Condiciones para el proceso de (PCR) para Listeria monocytogenes, Escherichia coli, Salmonella spp.*

# de ciclos	T (°C) / T <i>Listeria m.</i>	T (°C) / T <i>Salmonella spp.</i>	T (°C) / T <i>Escherichia coli</i>	Fases
1	95/2 min	95/5 min	95/2 min	Desnaturalización
	95/1 min	95/1 min	95/30 seg	Desnaturalización
30	53/45 seg	63/45 s	56/30 seg	Unión de iniciadores
	72/ 1 min	72/1 min	72/30 seg	Extensión

**Nota:** Tomado de: Meghdadi & Nassirabady(2019), Nuñez & Bayas (2020), Nuñez & Bayas (2019).

Los resultados de la (PCR) fueron visualizados mediante electroforesis, en una concentración de agarosa del 2% en 100 mL de la solución del tampón TAE 1X calentándolo en un microondas evitando la ebullición para que no se desnaturalice. La muestra que contiene el ADN de las bacterias se depositó en el gel de agarosa con el marcador de peso molecular para así evaluar el tamaño de los fragmentos de ADN amplificados se utilizó un marcador de pesos molecular 100pb (**INBIO HIGHWAYBS.A K0177**) y así mismo se depositaron los blancos positivos para *Salmonella spp*, *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli*. El proceso de electroforesis se ejecutó en 135 voltios en 30 minutos, una vez terminado este proceso de tinte el gel en la solución del tampón TAE 1X durante un tiempo de 25 minutos utilizando 4 µL colorante **Nucleic Acid Dye** de la marca **Diamond™** una vez transcurrido el tiempo se procedió a la visualización en el trasiluminador UV.

### **3.11. Tabulación.**

Según los resultados obtenidos de la recolección de datos se realizó tablas para así determinar los porcentajes existentes más importantes presentando datos estadísticos que resulten fáciles de comprender en lo cual se realizó una tabulación de variable cuantitativa discreta y se lo analizo en el software estadístico Statgraphics.

## CAPITULO IV

### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1. Resultados de georreferenciación con coordenadas mediante GPS.

Los resultados adquiridos mediante georreferenciación de los puntos donde se encuentran las empresas se detallan en la siguiente tabla:

**Tabla 17**

*Resultados de georreferenciación con coordenadas mediante GPS.*

<b>Código</b>	<b>Origen, Cantón</b>	<b>Estado de funcionamiento</b>	<b>Lugar de procedencia</b>	<b>Coordenadas</b>
T1	San Miguel	Trabaja	Av. Veintimilla y 10 de enero	<b>-1.707537, - 79.041008</b>
T2	Guaranda	Trabaja	Santa Fe	<b>-1.6212209, - 79.0130030</b>
T3	Guaranda	Cerrado temporalmente	Guanujo; 4 Esquinas	<b>-1.526933, - 78.991118</b>
T4	Guaranda	Cerrado temporalmente	Julio Moreno Recinto Cashapamba	<b>-1.573704, - 79.0273223</b>
T5	Guaranda	No existe	Simiatug	<b>No existe</b>
T6	Guaranda	Se traslado fuera de la Prov.	Alpachaca Sector UEB	<b>-1.568673, - 79.008234</b>
T7	Chimbo	Trabaja	Tamban ciud. Santa Marianita	<b>-1.676940,- 79.034867</b>
T8	Caluma	Cerrado temporalmente por mantenimiento	Vía Montalvo-Recinto Tablas De La Florida	<b>-1.665913,- 79.257549</b>
T9	Caluma	Trabaja	Caluma vía Guaranda a 100 metros de hostería Madera fina	<b>-1.613984,- 79.245890</b>
T10	Caluma	Trabaja	Rec. La Alsacia vía el santuario de la virgen.	<b>-1.670279,- 79.248331</b>

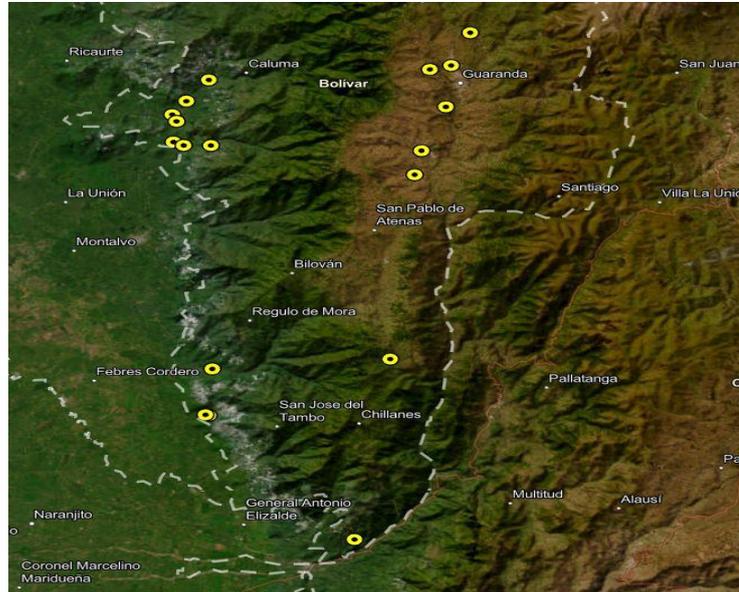
T11	Caluma	Trabaja	Calle: Anacarcis Camacho 1091 Av. La naranja	<b>-1.631103,- 79.258560</b>
T12	Caluma	Trabaja	Vía a Charquiyacu Recinto san Vicente	<b>-1.587021,- 79.225773</b>
T13	Caluma	Cerrado temporalmente	La Fortuna S/N Vía A La Esmeralda, Cerca El Complejo Deportivo La Roca	<b>-1.639717,- 79.254712</b>
T14	Chillanes, San José del Tambo	Cerrado se trasladó fuera	San José del Tambo (Tambopamba), vía San Vicente	<b>-1.954493,- 79.222586</b>
T15	Chillanes, San José del Tambo	Cerrado temporalmente	Recinto la Colombia, junto al subcentro de salud	<b>-2.013524,- 79.225983</b>
T16	Chillanes, San José del Tambo	Trabaja	Recinto Nuevo Porvenir	<b>-2.171292, - 79.094989</b>
T17	Chillanes	Trabaja	Quilayaco Calle: Continuación Regulo De Mora	<b>-1.941937,- 79.062981</b>
T18	Chillanes San José del Tambo	Trabaja	Frente a la escuela Colombia Alta	<b>-2.012749,- 79.228704</b>
19	Caluma	Trabaja	Vía al valle	<b>-1.670390,- 79.223931</b>

---

*Nota:* Trabajo experimental.

## Figura 20

### *Georreferenciación de las empresas embotelladoras de agua en la Provincia Bolívar*



En la tabla 17 se presenta los resultados de georreferenciación con el uso de un GPS y así mismo con las coordenadas en el software **ArcGIS** permitiendo medir la posición exacta de un punto dado de una localización geográfica mediante coordenadas específicas ubicando los lugares y direcciones exactas dentro de un mapa digital con el objeto de identificar cada una de las procesadoras de agua embotellada que se encuentran en la provincia Bolívar.

Al momento de visitar cada una de las plantas procesadoras de agua embotellada se pudo constatar que algunas no se encontraban en funcionamiento y otras se trasladaron fuera de la provincia debido a condiciones económicas.

### 4.3. Resultados microbiológicos

#### 4.3.1. Cuantificación de *Listeria* de las muestras de agua embotellada de las diferentes empresas que existen en la provincia Bolívar

**Tabla 18**

Valores obtenidos mediante resultados microbiológicos del primer, segundo y tercer muestreo.

Código	Parámetros	1era repetición 12 abril 2023	2da repetición 10 de mayo 2023	3era repetición 1 junio 2023	Unidad	Método de análisis de referencia
T1-T1,1- T1,2	<i>Listeria</i>	135	60	35	UFC/1 00mL	ISO 9001:2015
T2- T2,1-2,2		14	6	6		
T3-T3,1-T3,2		na	na	na		
T4-T4,1-T4,2		na	na	na		
T7-T7,1-T7,2		0	0	0		
T8-T8,1-T8,2		na	na	na		
T9-T9,1-T9,2		0	0	0		
T10-T10,1- T10,2		0	0	0		
T11-T11,1- T11,2		0	0	0		
T12-T12,1- T12,2		12	9	10		
T13-T13,1- T13,2		na	na	na		
T15-T15,1- T15,2		na	na	na		
T16-T16,1- T16,2		35	24	18		
T17-T17,1- T17,2		76	26	22		
T18-T18,1- T18,2		0	0	0		
T19-T19,1- T19,2		13	7	9		

**Max:** 0

En la tabla 18 se presenta el recuento de microorganismos de *Listeria monocytogenes* encontrados en las muestras T1-T1,1-T1,2-T2,T2,1-T2,2-T12-T12,1-T12,2-T16-T16,1-T16,2-T17-T17,1-T17,2-T19-T19,1,T19,2 de las marcas de botellas de agua realizadas tanto en el primer y segundo muestreo, expresando los resultados en UFC/mL, dando a conocer que no se realiza un proceso óptimo

de prácticas de higiene (BPH) y buenas prácticas de manufactura(BPM) durante el proceso, así como una buena filtración con micras de 0,02, cloración, asepsia durante el trascurso de embazado, un correcto uso de la lampara de rayos ultravioleta y un buen procedimientos de osmosis inversa; mientras que las marcas T7-T7,1-T7,2-T9-T9,1-T9,2-T10-T10,1-T10,2-T11-T11,1-T11,2-T18-T18,1-T18,2 no presentan ninguna concentración de UFC/mL indicando así que estas muestras de las empresas cumplen con los parámetros establecidos que es  $<1,0 \times 10^0$  representando ausencia.

#### **4.3.2. Aislamiento, purificación e identificación microscópica de las colonias de *Listeria* presentes en las muestras de agua embotellada de las empresas que expenden en la provincia Bolívar.**

**Tabla 19**

*Identificación y diferenciación microscópica mediante tinción de gram de las colonias aisladas de Listeria de las muestras de agua purificada y embotellada.*

<b>Muestra</b>	<b>Código</b>	<b>Gram</b>
<b>T1</b>	T1	Bacilos (+)
	T1,1	Bacilos (+)
	T1,2	Bacilos (+)
<b>T2</b>	T2	Bacilos (+)
	T2,1	Bacilos (+)
	T2,2	Bacilos (+)
<b>T12</b>	T12	Bacilos (+)
	T12,1	Bacilos (+)
	T12,2	Bacilos (+)
<b>T16</b>	T16	Bacilos (+)
	T16,1	Bacilos (+)
	T16,2	Bacilos (+)
<b>T17</b>	T17	Bacilos (+)
	T17,1	Bacilos (+)
	T17,2	Bacilos (+)
<b>T19</b>	T19	Bacilos (+)
	T19,1	Bacilos (+)
	T19,2	Bacilos (+)

*Nota:* Trabajo experimental.

**Tabla 20***Anova para Listeria.*

<b>Fuente</b>	<b>Suma Cuadrados</b>	<b>de Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
Entre grupos	17461,3	10	1746,13	5,16	0,0006**
Intra grupos	7442,0	22	338,273		
Total	24903,3	32			

*Nota:* Trabajo experimental

En la tabla 20 se detallan el resultado del análisis de Listeria de los diferentes tratamientos, indicando que existe diferencia estadísticamente significativa para cada uno de los tratamientos realizados de las muestras, puesto que los valores de  $p$  son menores que 0,05 incidiendo los resultados de *Listeria* con un 95,0 % del nivel de confiabilidad.

Por lo tanto, debido a que existe una diferencia estadísticamente significativa entre estos factores se realizó un análisis de pruebas de rangos múltiples por el método de Tukey HSD para determinar las medias de cada repetición.

**Tabla 21***Pruebas de Múltiple Rangos para Listeria por el método de Tukey HSD.*

<b>Tratamientos</b>	<b>Casos</b>	<b>Media</b>	<b>Grupos Homogéneos</b>
T18	3	0	A
T9	3	0	A
T7	3	0	A
T10	3	0	A
T11	3	0	A
T2	3	8,66	A
T19	3	9,66	A
T12	3	10,33	A
T16	3	25,66	AB
T17	3	41,33	AB
T1	3	76,66	B

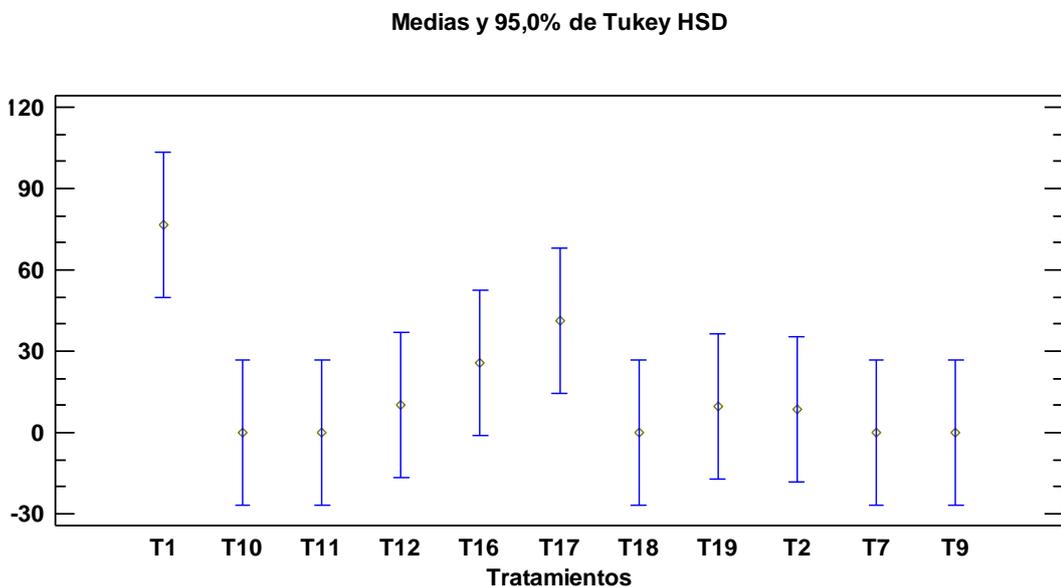
*Nota:* Trabajo experimental

En la tabla 21 se detalla que la media más alta para *Listeria* corresponde a la marca de agua embotellada T1 con un porcentaje de la media de 76,66 seguido por T17 con una concentración 41,33 encontrándose así los más altos de todas las otras marcas, mientras que en T2 tiene una concentración de media de 8,66 en las tres repeticiones siendo un resultado de media más bajo de *Listeria* y así mismo con los demás demostrando así que existe una diferencia estadística.

A continuación, se detalla el gráfico de medias:

**Figura 21**

*Medias de los porcentajes de Listeria*



*Nota:* Trabajo experimental

En la figura 21 se detalla que las medias de cada muestra en los porcentajes de concentración de *Listeria* son diferentes destacándose en cada una de estas, por tal razón se comprueba que existe una diferencia estadísticamente significativa con un 95% de confianza.

**4.3.3. Cuantificación de *E. coli* de las muestras de agua embotellada de las diferentes empresas.**

**Tabla 22**

*Valores obtenidos mediante resultados microbiológicos del primer y segundo muestreo.*

Código	Parámetros	1era repetición 12 abril 2023	2da repetición 10 de mayo 2023	3era repetición 1 junio 2023	Unidad	Método de análisis de referencia
T1-T1,1- T1,2		53	24	15		
T2- T2,1-2,2		0	0	0		
T3-T3,1-T3,2		na	na	na		
T4-T4,1-T4,2		na	na	na		
T7-T7,1-T7,2		0	0	0		
T8-T8,1-T8,2		na	na	na		
T9-T9,1-T9,2		0	0	0		
T10-T10,1-T10,2		17	12	9		
T11-T11,1-T11,2		0	0	0	UFC/10 0mL	NTE INEN- ISO 9308- 1
T12-T12,1-T12,2	<i>E. coli</i>	0	0	0		
T13-T13,1-T13,2		na	na	na		
T15-T15,1-T15,2		na	na	na		
T16-T16,1-T16,2		0	0	0		
T17-T17,1-T17,2		37	14	10		
T18-T18,1-T18,2		0	0	0		
T19-T19,1-T19,2		16	12	10		

**Max:0**

*Nota:* Trabajo experimental.

En la tabla 22 se presenta el recuento de microorganismos de *E. Coli* encontrados en las muestras T1-T1,1-T1,2-T10-T10,1-T10,2-T17-T17,1-T17,2-T19-T19,1-T19,2 de las marcas de botellas de agua realizadas tanto en el primer y segundo muestreo, expresando los resultados en UFC/mL, dando a conocer que no se realiza un proceso óptimo de prácticas de higiene (BPH) durante el proceso, así como una

buena filtración con micras de 0,02, cloración, asepsia durante el trascurso de embazado, un correcto uso de la lampara de rayos ultravioleta y un buen procedimientos de osmosis inversa; mientras que las marcas T2-T2,1-T2,2-T7-T7,1-T7,2-T9-T9,1-T9,2,T11-T11,1-T11,2,T12-T12,1-T12,2-T16-T16,1-T16,2-T18-T18,1-T18,2 no presentan ninguna concentración de UFC/mL indicando así que estas muestras de las empresas cumplen con los parámetros establecidos por la norma NTE INEN 2200 que es  $<1,0 \times 10^0$  representando ausencia.

**4.3.4. Aislamiento, purificación e identificación microscópica de las colonias de *E. Coli* presentes en las muestras de agua embotellada de las empresas que expenden en la Provincia Bolívar.**

**Tabla 23**

*Identificación y diferenciación microscópica mediante tinción de gram de las colonias aisladas de E. Coli de las muestras de agua purificada y embotellada.*

<b>Muestra</b>	<b>Código</b>	<b>Gram</b>
	T1	Bacilos (-)
<b>T1</b>	T1,1	Bacilos (-)
	T1,2	Bacilos (-)
	T10	Bacilos (-)
<b>T10</b>	T10,1	Bacilos (-)
	T10,2	Bacilos (-)
	T17	Bacilos (-)
<b>T17</b>	T17,1	Bacilos (-)
	T17,2	Bacilos (-)
	T19	Bacilos (-)
<b>T19</b>	T19,1	Bacilos (-)
	T19,2	Bacilos (-)

*Nota:* Trabajo experimental.

**Tabla 24***Anova Escherichia coli.*

<b>Fuente</b>	<b>Suma Cuadrados</b>	<b>de Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
Entre grupos	3435,21	10	343,521	5,98	0,0002**
Intra grupos	1264,67	22	57,4848		
Total	4699,88	32			

*Nota:* Trabajo experimental

En la tabla 24 se detallan el resultado del análisis de *Escherichia coli*. de los diferentes tratamientos, indicando que existe diferencia estadísticamente significativa para cada uno de los tratamientos realizados de las muestras, puesto que los valores de *p* son menores que 0,05 incidiendo los resultados de *Escherichia coli*. con un 95,0 % del nivel de confiabilidad.

Por lo tanto, debido a que existe una diferencia estadísticamente significativa entre estos factores se realizó un análisis de pruebas de rangos múltiples por el método de Tukey HSD para determinar las medias de cada repetición.

**Tabla 25***Pruebas de Múltiple Rangos para Escherichia coli por el método de Tukey HSD.*

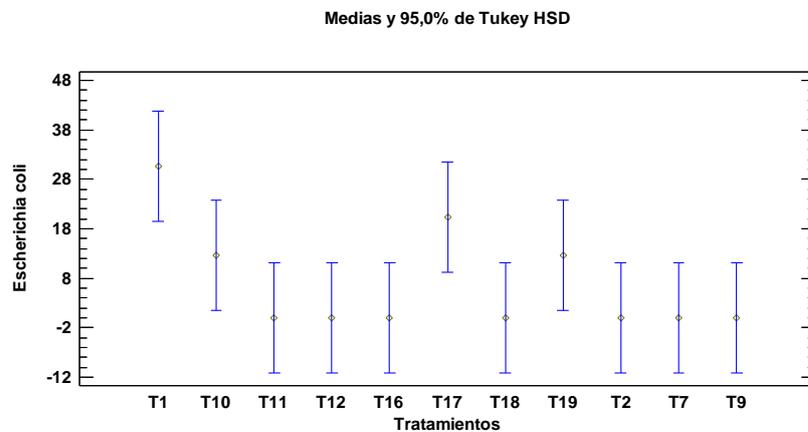
<b>Tratamiento</b>	<b>Casos</b>	<b>Media</b>	<b>Grupos Homogéneos</b>
T2	3	0	A
T9	3	0	A
T7	3	0	A
T16	3	0	A
T11	3	0	A
T18	3	0	A
T12	3	0	A
T19	3	12,66	AB
T10	3	12,66	AB
T17	3	20,33	AB
T1	3	30,66	B

*Nota:* Trabajo experimental

En la tabla 25 se detalla que la media más alta para *Escherichia coli*. corresponde a la marca de agua embotellada T1 con un porcentaje de media de 30,66 seguido por T17 con una concentración 23,33 encontrándose así los más altos de todas las otras marcas, mientras que en T12 tiene una concentración de media de 12,66 en las tres repeticiones siendo un resultado de media bajo de *Escherichia coli*. y así mismo con los demás demostrando así que existe una diferencia estadística. A continuación, se detalla el grafico de medias:

**Figura 22**

*Medias de los porcentajes de Escherichia coli.*



*Nota:* Trabajo experimental

En la figura 22 se detalla que las medias de cada muestra en los porcentajes de concentración de *E. Coli* son diferentes destacándose en cada una de estas, por tal razón se comprueba que existe una diferencia estadísticamente significativa con un 95% de confianza.

**4.3.5. Cuantificación de *Salmonella* de las muestras de agua embotellada de las diferentes empresas.**

**Tabla 26**

*Valores obtenidos mediante resultados microbiológicos del primer y segundo muestreo.*

Código	Parámetros	1era repetición 12abril 2023	2da repetición 10 de mayo 2023	3era repetición 1 junio 2023	Unidad	Método de análisis de referencia
T1-T1,1- T1,2	<i>Salmonella</i>	0	0	0	UFC/10 0mL	ISO 19250:2013
T2- T2,1-2,2		0	0	0		
T3-T3,1-T3,2		na	na	na		
T4-T4,1-T4,2		na	na	na		
T7-T7,1-T7,2		0	0	0		
T8-T8,1-T8,2		na	na	na		
T9-T9,1-T9,2		0	0	0		
T10-T10,1- T10,2		0	0	0		
T11-T11,1- T11,2		0	0	0		
T12-T12,1- T12,2		13	8	9		
T13-T13,1- T13,2		na	na	na		
T15-T15,1- T15,2		na	na	na		
T16-T16,1- T16,2		0	0	0		
T17-T17,1- T17,2		0	0	0		
T18-T18,1- T18,2		0	0	0		
T19-T19,1- T19,2		57	24	16		

**Max: 0**

Nota: Trabajo experimental

En la tabla 26 se presenta el recuento de microorganismos de *Salmonella* encontrados en las muestras T12-T12,1-T12,2 y T19-T19,1-T19,2 de las marcas de botellas de agua realizadas tanto en el primer y segundo muestreo, expresando los resultados en UFC/mL, dando a conocer que no se realiza un proceso óptimo de prácticas de higiene (BPH) durante el proceso, así como una buena filtración

con micras de 0,02, cloración, asepsia durante el trascurso de embazado, un correcto uso de la lampara de rayos ultravioleta y un buen procedimientos de osmosis inversa; mientras que las marcas T1-T1,1-T1,2-T2-T2,1-T2,2-T7-T7,1-T7,2-T9-T9,1-T9,2-T10-T10,1-T10,2-T11-T11,1-T11,2-T16-T16,1-T16,2-T17-T17,1-T17,2-T18-T18,1-T18,2 no presentan ninguna concentración de UFC/mL indicando así, que estas muestras de las empresas cumplen con los parámetros establecidos que es  $<1,0 \times 10^0$  representando ausencia.

#### 4.3.6. Aislamiento, purificación e identificación microscópica de las colonias de Salmonella presentes en las muestras de agua embotellada de las empresas que expenden en la provincia Bolívar

**Tabla 27**

*Identificación y diferenciación microscópica mediante tinción de gram de las colonias aisladas de Salmonella spp. de las muestras de agua purificada embotellada.*

Muestra	Código	Gram
	T12	Bacilos (-)
<b>T12</b>	T12.1	Bacilos (-)
	T12.2	Bacilos (-)
	T19	Bacilos (-)
<b>T19</b>	T19.1	Bacilos (-)
	T19.1	Bacilos (-)

*Nota:* trabajo experimental.

**Tabla 28**

*Anova para Salmonella spp.*

Fuente	Suma Cuadrados	de Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2947,58	10	294,758	6,76	0,0001**
Intra grupos	958,667	22	43,5758		
Total	3906,24	32			

*Nota:* Trabajo experimental

En la tabla 28 se detallan el resultado del análisis de *Salmonella spp.* de los diferentes tratamientos, indicando que existe diferencia estadísticamente

significativa para cada uno de los tratamientos realizados de las muestras, puesto que los valores de  $p$  son menores que 0,05 incidiendo los resultados de *Salmonella* con un 95,0 % del nivel de confiabilidad.

Por lo tanto, debido a que existe una diferencia estadísticamente significativa entre estos factores se realizó un análisis de pruebas de rangos múltiples por el método de Tukey HSD para determinar las medias de cada repetición.

**Tabla 29**

*Pruebas de Múltiple Rangos para Salmonella por el método de Tukey HSD.*

<b>Tratamientos</b>	<b>Casos</b>	<b>Media</b>	<b>Grupos Homogéneos</b>
T9	3	0	A
T11	3	0	A
T1	3	0	A
T16	3	0	A
T17	3	0	A
T18	3	0	A
T10	3	0	A
T2	3	0	A
T7	3	0	A
T12	3	10,0	B
T19	3	32,33	C

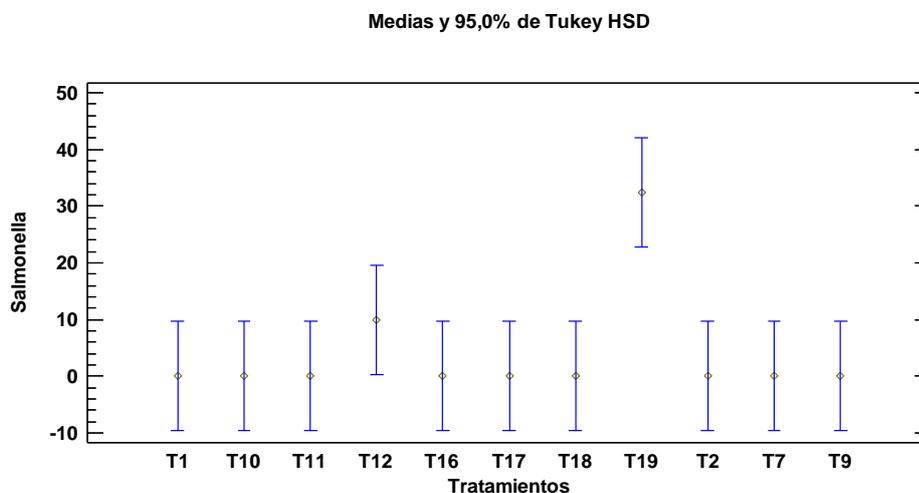
*Nota:* trabajo experimental.

En la tabla 29 se detalla que la media más alta para *Salmonella spp* corresponde a la marca de agua embotellada T19 con un porcentaje de media de 32,33 seguido por T12 con una concentración 10,0 encontrándose así los más altos mientras que las otras marcas no presentan medias debido a que no hubo presencia de microorganismos, pero existiendo una diferencia estadística para los dos tratamientos.

A continuación, se detalla el gráfico de medias:

**Figura 23**

*Medias de los porcentajes de Salmonella spp.*



*Nota:* Trabajo experimental

En la figura 23 se detalla que las medias de cada muestra en los porcentajes de concentración de *Salmonella* son diferentes destacándose en cada una de estas, por tal razón se comprueba que existe una diferencia estadísticamente significativa con un 95% de confianza

#### **4.3.7. Identificación de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.* y *Escherichia coli* mediante Reacción de Cadena Polimerasa (PCR).**

Una vez purificadas las muestras en agares selectivos tras confirmaciones tanto microscópicas como microbiológicas de cada microorganismo como son *Listeria*, *Escherichia coli* y *Salmonella* se procedió a la extracción de ADN y análisis molecular para lo cual se utilizó **Genomic DNA Mini kit k182001** en el cual se realizó de acuerdo al protocolo del fabricante conteniendo en el mismo todos los reactivos necesarios para realizar el proceso. Una vez terminada extracción de ADN de los tres microorganismos se analiza el porcentaje de pureza en el **Espectrofotómetro Nanodrop One** Marca: **THERMO SCIENTIFIC** observando los resultados de pureza de ADN que contine cada microorganismo.

Para la extracción de ADN se empleó un total de 36 aislados de *Listeria*, *Escherichia coli* y *Salmonella* que fueron obtenidos de las muestras de las empresas de agua embotellada que existen en la provincia Bolívar tras previos análisis

microbiológicos selectivos y comprobaciones microscópicas como es la técnica de tinción de gram.

#### **4.3.8. Concentración y calidad de ADN extraída mediante Genomic DNA Mini kit k182001**

La cuantificación de ADN se realizó mediante absorbancia UV a 260 nm. El rendimiento obtenido es las eluciones que fueron realizadas de 2x200  $\mu$ L.

#### **Concentración de ADN de *Listeria***

#### **Tabla 30**

*Concentración de ADN mediante Espectrofotómetro Nanodrop para *Listeria monocytogenes*.*

<b>Aislados de listeria</b>	<b>Nanodrop</b>
Código	ng/ $\mu$ L
T1	73,9
T1	68,3
T1	80,5
T2	48,9
T2	56,4
T2	78,5
T12	98,2
T12	87,4
T12	93,5
T16	78,5
T16	65,1
T16	57,8
T17	104,3
T17	98,5
T17	107,2
T19	54,6
T19	78,9
T19	63,6

### Concentración de ADN de *Escherichia coli*

**Tabla 31**

*Concentración de ADN mediante Espectrofotómetro Nanodrop para Escherichia coli*

<i>Escherichia coli</i>	Nanodrop
Código	ng/μL
T1	56,8
T1	70,5
T1	68,9
T10	93,4
T10	76,7
T10	87,6
T17	101,8
T17	99,4
T17	102,5
T19	89,1
T19	97,2
T19	83,9

### Concentración de ADN de *Salmonella*

**Tabla 32**

*Concentración de ADN mediante Espectrofotómetro Nanodrop para Salmonella*

<i>Salmonella</i>	Nanodrop
Código	ng/μL
T12	54,7
T12	77,2
T12	94,6
T19	48,9
T19	62,4
T19	70,6

Los resultados de cada una de las concentraciones presentan índices recomendados de pureza como son en las relaciones de absorbancia de (260/280) considerándose que un ADN de pureza optima debe tener un valor de un rango  $\geq 1.6$  a 2.1 (Departamento de control de calidad del Banco Nacional de ADN, 2020).

El rendimiento de ADN varía según la muestra y el contenido de ADN de la muestra.

Dando a conocer que los resultados obtenidos de ADN tienen una concentración optima y satisfactoria para realizar análisis de grado molecular.

Entre un total de los 36 aislados de *Listeria*, *Escherichia coli* y *Salmonella* que se extrajo el ADN con el **Genomic DNA Mini kit k182001**, se logró obtener diferentes concentraciones de ADN, obteniendo el valor más alto para *Listeria* que dé fue T17 con 107,2 ng/ $\mu$ L y menor T2 con 48,9 ng/ $\mu$ L, para *Escherichia coli* el más alto fue T17 con 102,5 ng/ $\mu$ L y menor T1 con 56,8 ng/ $\mu$ L y para *Salmonella* el tratamiento T12 con un valor de 94,6 ng/ $\mu$ L y menor con T12 con 54,7 ng/ $\mu$ L todos estos resultados obtenidos estuvieron dentro de los valores de referencia considerándose ADN de calidad optima. .

#### **4.4. Análisis molecular**

##### **4.4.1. Detección de *Listeria monocytogenes* mediante reacción de cadena de polimerasa (PCR).**

Del ADN extraído de los aislados de *Listeria monocytogenes* fue analizado y amplificado mediante el método descrito por (Meghdadi & Nassirabady, 2019). Para la amplificación de *Listeria monocytogenes* se utilizó los cebadores de marca Invitrogen cuya secuencia fueron: *Listeria* (R,5'-GCCGTCGATGATTTGAACTTCATC-3') y *Listeria* (F,5'-GAATGTAAACTTCGGCGCAATCAG-3') que reconocen el género de *Listeria* amplificado en fragmentos aproximadamente de 388 bp.

De las 11 muestras recogidas por triplicado, tres para cada código pertenecieron a T1, T2, T12, T16, T17, T19 mismas que fueron extraídas el ADN y analizadas mediante PCR

Las condiciones en el termociclador para realizar el proceso fueron las siguientes: Un ciclo a 95°C durante un tiempo de dos minutos, 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por un minuto, el anillamiento a 53°C por un tiempo de 45 segundos, la

extensión a 72°C por un minuto y la extensión final a 72°C por 7 minutos y para que se mantenga se bajó a 4 °C durante un tiempo de 7 minutos.

Mediante el análisis PCR y la técnica de electroforesis tras observar en la foto documentador con luz ultravioleta los resultados de los aislados pertenecieron a la especie de *L. monocytogenes* en el cual se utilizó controles positivos de *Listeria monocytogenes*.

#### Figura 24

Resultados de electroforesis después de realizar PCR con los aislados de *Listeria* donde pb es el marcador de peso molecular, L+ es el control positivo y T son las muestras de ADN.



#### 4.4.2. Detección de *Escherichia coli* mediante reacción de cadena de polimerasa (PCR).

Del ADN extraído de los aislados de *Escherichia coli* fue analizado y amplificado mediante el método descrito por (Nuñez & Bayas, 2019).

Para la amplificación se utilizó los cebadores con su serotipo O157:H7 de marca Invitrogen cuya secuencia fueron: *E. Coli* (R,5'-GCTATTTCTGCGATAAGAGA-3') y *E. coli* (F,5'-CCAGGCAAAGAGTTTATGTTGA-3') que reconocen el género de *Escherichia coli* amplificado en fragmentos aproximadamente de 212 bp.

De las 11 muestras recogidas por triplicado, tres para cada una de las marcas pertenecieron a T1, T10, T17 y T19 mismas que fueron extraídas el ADN y analizadas mediante PCR.

Las condiciones en el termociclador para realizar el proceso fueron las siguientes:

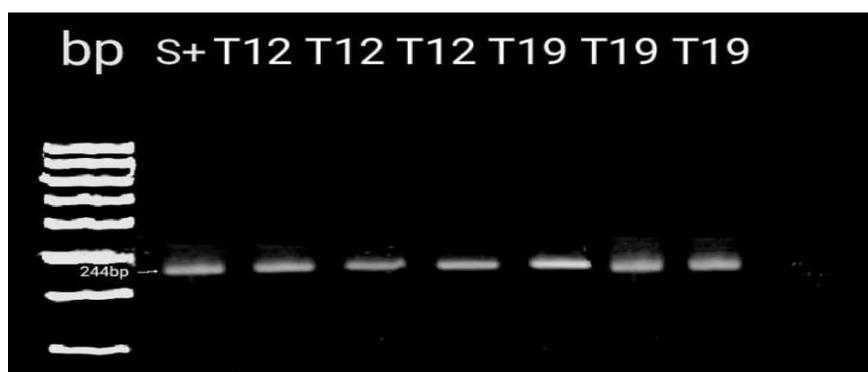


Las condiciones en el termociclador para realizar el proceso fueron las siguientes: Un ciclo a 95°C durante un tiempo de 5 minutos, 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por un minuto, el anillamiento a 63°C por un tiempo de 45 segundos, la extensión a 72°C por un minuto y la extensión final a 72°C por 5 minutos y para que se mantenga se bajó a 4 °C durante un tiempo indefinido.

Mediante el análisis PCR y la técnica de electroforesis tras observar en la foto documentador con luz ultravioleta los resultados de los aislados pertenecieron a la especie de *Salmonella spp* en el cual se utilizó controles positivos de *Salmonella spp*.

**Figura 26**

*Resultados de electroforesis después de realizar PCR con los aislados de Salmonella spp. donde pb es el marcador de peso molecular S+ es el control positivo y T son las muestras de ADN.*



**Tabla 33**

*Resultados de ADN extraído y analizado mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de Listeria monocytogenes.*

<b>Aislados de Listeria</b> Código	<b>Nanodrop</b> ng/μL	<b>PCR</b>
T1	73,9	+
T1	68,3	+
T1	80,5	+
T2	48,9	+
T2	56,4	+
T2	78,5	+

T12	98,2	+
T12	87,4	+
T12	93,5	+
T16	78,5	+
T16	65,1	+
T16	57,8	+
T17	104,3	+
T17	98,5	+
T17	107,2	+
T19	54,6	+
T19	78,9	+
T19	63,6	+

En la tabla 33 se muestran los resultados de los 18 aislados analizados mediante PCR con los primers específicos como son *Listeria* F y *Listeria* R, teniendo buenos resultados positivos para *Listeria*, dando a analizar en las bandas del marcador de peso molecular un estimado de 388 pb dando positivo para el género de estudio.

**Tabla 34**

*Resultados de ADN extraído y analizado mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de Escherichia coli.*

<i>Escherichia coli.</i>	Nanodrop	PCR
Código	ng/μL	
T1	56,8	+
T1	70,5	+
T1	68,9	+
T10	93,4	+
T10	76,7	+
T10	87,6	+
T17	101,8	+
T17	99,4	+
T17	102,5	+

T19	89,1	+
T19	97,2	+
T19	83,9	+

La tabla 46 muestra los 12 aislados analizados mediante PCR con los primers específicos como son *E. coli* F y *E. coli* R, teniendo buenos resultados positivos para *Escherichia coli* mismo que reconoció el serotipo O157:H7 mostrando en las bandas características un estimado de 212bp.

### Tabla 35

*Resultados de ADN extraído y analizado mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de Salmonella spp.*

<i>Salmonella</i> Nanodrop		PCR
Código	ng/μL	
T12	54,7	+
T12	77,2	+
T12	94,6	+
T19	48,9	+
T19	62,4	+
T19	70,6	+

En la tabla 35 se muestran los 6 aislados analizados mediante PCR con los primers específicos como son Inva3F y Inva3R, teniendo buenos resultados positivos para *Salmonella* mostrando en las bandas características un estimado de 244pb.

#### 4.4.4. Frecuencias y porcentajes para casos positivos

### Tabla 36

*Tabla de frecuencias y porcentajes para casos positivos de Listeria monocytogenes por PCR.*

Positivas PCR	Frecuencias	Porcentaje %
T1	3	17

T2	3	17
T12	3	17
T16	3	17
T17	3	16
T19	3	16
Total	18	100

En la tabla 36 se puede observar los porcentajes y frecuencias de los casos que salieron positivos para PCR encontrándose 18 casos positivos para *Listeria monocytogenes* conformados por T1 (3/18) con un 17%, T2 (3/18) con un 17%, T12 (3/18), con un 17%, T16 (3/18) con un 17%, T17 (3/18) con un 16%, y T19 (3/18) con un 16% encontradas en las diferentes muestras de marcas de agua embotellada que se encuentran en los diferentes cantones de la Provincia Bolívar.

**Tabla 37**

*Tabla de frecuencias y porcentajes para casos positivos de Escherichia coli.*

Positivas PCR	Frecuencias	Porcentaje %
T1	3	25
T10	3	25
T17	3	25
T19	3	25
Total	12	100

La tabla 37 se puede observar los porcentajes y frecuencias de los casos que salieron positivos para PCR encontrándose 12 casos positivos para *Escherichia coli* conformados por T1(3/12) con un 25%, T10(3/12) con un 25%, T17 (3/12) con un 25%, T19 (3/12) con un 25%, encontradas en las diferentes muestras de marcas de agua embotellada que se encuentran en los diferentes cantones de la Provincia Bolívar.

**Tabla 38**

*Tabla de frecuencias y porcentajes para casos positivos de Salmonella spp.*

Positivas PCR	Frecuencias	Porcentaje %
------------------	-------------	-----------------

T12	3	50
T19	3	50
Total	6	100

En la tabla 38 se puede observar los porcentajes y frecuencias de los casos que salieron positivos para PCR encontrándose 6 casos positivos para *Salmonella spp.* conformados por T12 (3/6) con un 50%, T19 (3/6) con un 50%, encontradas en las diferentes muestras de marcas de agua embotellada que se encuentran en los diferentes cantones de la Provincia Bolívar.

Como se puede evidenciar en las tablas mostradas se comprobó un mayor número de casos positivos para los microorganismos de estudio tanto de *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Salmonella spp.* en las diferentes marcas de agua que se encuentran en los cantones de la provincia. Según Sanchez, (2019), la presencia de estos microorganismos da a conocer si el agua es apta o no para consumirla mostrando en los resultados microbiológicos las condiciones sanitarias del producto tanto como manipulación, embotellamiento y proceso. Tomando en (Swistock, Efectos de las bacterias coliformes sobre la salud, 2023) cuenta que los microorganismos presentes sobrepasan los parámetros establecidos por la norma NTE INEN 2200:2017. Existen diferentes factores al momento de purificar el agua como son las micras de los filtros de agua que no se encuentran en un numero a adecuado o no son cambiadas durante mucho tiempo, algunos de los equipos para la purificación del agua no tienen un buen mantenimiento o no los realizan existiendo un mal proceso de purificación dando lugar a que existan la presencia de microorganismos en el agua. Para Swistock( 2023), la precencia de estos microorganismos patogesnos puede llevar a un estado de efermedades gastrointestinales y en casos mas delicados sindrome hemolitico huremico (SUH/SHU) siendo en este caso los mas perjudicados los niños y personas de tercera edad causando inclusive hasta la muerte.Por lo tanto los estandares establecidos por las normas vigentes establece que no existan bacterias coliformes precentes en el agua embotellada para consumo humano.Para (Aconsa, 2022)Aconsa (2023), las personas que consuman una agua mal tratada ya sea de diferentes fuentes tanto embotellada, potable,de rios o riachuelos corren el

riesgode infectarse con la toxina de *Escheriachia coli* mismos que es productor de la toxina shiga (STEC).

## 4.5. COMPROBACIÓN DE LA HIPÓTESIS

### 4.5.1. Hipótesis nula ( $H_0$ )

Cada (PCR) reacción en cadena de la polimerasa en tiempo final en el agua de las empresas embotelladoras de la Provincia Bolívar para consumo humano no se confirma la presencia de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.* y *Escherichia coli* que afectan la calidad microbiológica del agua embotellada purificada.

$$H_0: \mu_1 = \mu_1$$

### 4.5.2. Hipótesis Alterna ( $H_i$ )

Cada (PCR) reacción en cadena de la polimerasa en tiempo final en el agua de las empresas embotelladoras de la Provincia Bolívar para consumo humano se confirma la presencia de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.* y *Escherichia coli* que afectan la calidad microbiológica del agua embotellada purificada.

$$H_i: \mu_1 \neq \mu_1$$

### 4.5.3. Verificación de hipótesis

Los resultados obtenidos mediante análisis estadísticos aplicando la prueba Tukey indica que existe una incidencia directa en las muestras de agua embotellada de las empresas que existen en los diferentes Cantones de la Provincia Bolívar, analizando diferentes características como análisis microbiológicos, análisis biomoleculares (PCR) reacción de la cadena de la polimerasa y electroforesis indicando que existe evidencia tanto en análisis como estadísticamente por lo tanto se rechaza la hipótesis nula y se acepta la alterna.

## 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1. Conclusiones

- Mediante los análisis microbiológicos con el uso de medios de cultivos específicos se permitió la identificación de los microorganismos de estudio, mediante la cuantificación medidas en UFC/100mL en lo cual las marcas de agua embotella que se encuentran contaminadas son T1, T2, T12, T16, T17, T19 para *Listeria monocytogenes* con un porcentaje de contaminación del 54,5 % (6/11), seguidas de T1, T10, T17, T19 para *Escherichia coli* con un porcentaje de 36% (4/11), y para *Salmonella* T12, T19 con un porcentaje de 18% (2/11), sobrepasando los parámetros establecidos en la norma NTE INEN 2200-2017. Mientras que en las marcas T7, T9, T11, T18 no presentaron crecimiento alguno de los microorganismos de estudio cumpliendo con los estándares exigidos por la norma.
- Se comparo la presencia de microorganismos patógenos con la técnica de (PCR) Reacción en cadena de la polimerasa ya que existe una confianza del 99,9% de efectividad siendo esta una prueba confirmativa. Los patógenos presentes en los medios selectivos determinado el serotipo en base a las secuencias y de esta manera se contrasto la presencia de los serotipos de las muestras ya contaminadas antes ya estudiadas en medios selectivos y se reafirma con los serotipos de *E. coli* O157:H7 y con la familia de *Listeria* y *Salmonella*.
- El proceso para realizar los análisis microbiológicos y confirmaciones microscópicas (tinción de gram) para la determinación de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.* y *Escherichia coli* tiene un tiempo de duración de 9 días dentro del mismo se encuentra tiempo de incubación, lectura de placas medidas UFC/10mL, confirmaciones mediante tinción de gram y purificación de los microorganismos de estudio obtenidos. Mientras que en el proceso (PCR) reacción en cadena de la polimerasa tiene un tiempo de estudio de 1 día dentro de estas incluye extracción de ADN, amplificación mediante termociclador y electroforesis demostrando que el tiempo de detección molecular es menor que el microbiológicos.

## 5.2. Recomendaciones

- Se recomienda utilizar en cuanto al tiempo placas petrifilm debido a que estas ya contienen los nutrientes necesarios y el tinte indicador permitiendo la identificación de un microorganismo, mientras que en los medios de cultivo tiene un tiempo de preparación
- Se recomienda realizar análisis microbiológicos constantemente ya sea por lotes, al agua que llega a la empresa verificando así las condiciones en la que se encuentra, se debe dar un mantenimiento constante a todos los equipos que se utiliza para tratar el agua embotella y mantener capacitado al personal en lo que son las BPM.
- Empleando las técnicas de biología molecular PCR se determina que se puede realizar en cortos tiempos dando respuestas de un 99.9% efectividad mientras que con el uso de medios de cultivo tiene una efectividad del 70% pero el tiempo para el análisis es más largo.
- En el proceso de determinación de microorganismos patógenos del agua embotellada se recomienda utilizar el método de PCR ya que el tiempo y efectividad es mucho menor que el en medios selectivos.

## 6. BIBLIOGRAFÍA.

Dirección General de Salud,(DIGESA). (2017). *Parámetros Organolépticos Y Físico - Químico Del Agua*. DIGESA, Lince-Peru. Recuperado el 20 de Septiembre de 2022

Placas Petrifilm™Guía de Interpretación. (19 de Octubre de 2015). Recuperado el 14 de Octubre de 2022, de <https://multimedia.3m.com/mws/media/1624098O/3m-petrifilm-placas-e-coli-ec-guia-de-interpretacion.pdf>

Caldo de Enriquecimiento para Listeria (ISO 11290-1:1996, ISO 11290-2:2000). (9 de Septiembre de 2015). *Medioscultivo*. Recuperado el 16 de Octubre de 2022

Aconsa. (2022). *aconsa-lab*. Recuperado el 29 de Septiembre de 2022, de <https://aconsa-lab.com/bacterias-en-el-agua/>

Aconsa. ( de de 2022). E. coli en el agua: ¿Cómo llega a ella? ¿Representa un peligro? *Aconsa*, na. Recuperado el 9 de Noviembre de 2022, de <https://aconsa-lab.com/e-coli-agua-peligro/>

Aconsa. (2023). *E. coli en el agua: ¿Cómo llega a ella? ¿Representa un peligro?* Recuperado el 13 de octubre de 2023, de Aconsa: <https://aconsa-lab.com/e-coli-agua-peligro/>

Álvarez, S., Reyes, D., & González, D. ( de de 2018). *conogasi*. Recuperado el 25 de Septiembre de 2022

AQUAE. ( de de 2021). *fundacionaquae*. Recuperado el 15 de Septiembre de 2022, de [www.fundacionaquae.org-que-es-agua-destilada](http://www.fundacionaquae.org-que-es-agua-destilada)

Aquafree. (26 de Mayo de 2021). Bacterias y gérmenes del agua corriente. *Aquafree*, na. Recuperado el 25 de Septiembre de 2022, de <https://www.aqua-free.com/es/revista/bacterias-y-germenes-del-agua-corriente>

- Arcia, A. (2018). *Detección Molecular De Comunidades Microbianas En Agua*. Sucre. Recuperado el 15 de Septiembre de 2022, de <https://repositorio.unicordoba.edu.com>
- ARCSA. (25 de Junio de 2020). Plantas purificadoras: Realidad del agua embotellada en Ecuador. *Dilanet*, 695. Recuperado el 21 de Octubre de 2022
- Arteaga, E., & Morocho, E. (2016). *Requisitos Sanitarios De Las Plantas Y Proceso De Las Envasadoras De Agua*. Escuela Superior Politécnica De Chimborazo, Bioquímica Farmacéutica, Riobamba. Recuperado el Viernes de Octubre de 2022, de <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/5770/1/56T00663.pdf>
- Arumi, M. (2022). *microbiologiaparahumanos*. Recuperado el 26 de Noviembre de 2022, de <https://microbiologiaparahumanos.wordpress.com/medios-de-cultivo/>
- Barrera, K. (2019). *Por picadura y estría en la superficie*. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Bromatología, Riobamba. Recuperado el 24 de Noviembre de 2022, de <https://www.studocu.com/ec/document/escuela-superior-politecnica-de-chimborazo/microbiologia-y-parasitologia/tecnicas-de-siembra-para-microbiologia/26754496>
- Beltran, P. (2022). *medicoplus*. Recuperado el 26 de Noviembre de 2022, de <https://medicoplus.com/ciencia/medios-cultivo-bacterias>
- Bigstock. (26 de Octubre de 2020). *65ymas.com*. Recuperado el 29 de Septiembre de 2020, de [https://www.65ymas.com/alimentacion/tipos-agua-embotellada-cual-es-mejor\\_20513\\_102.html](https://www.65ymas.com/alimentacion/tipos-agua-embotellada-cual-es-mejor_20513_102.html)
- Britania, I. (2021). *britannialab*. Recuperado el 28 de Noviembre de 2022, de [https://www.britnialab.com/back/public/upload/productos/upl\\_6070756160103.pdf](https://www.britnialab.com/back/public/upload/productos/upl_6070756160103.pdf)
- Byram, M. (2021). *Informe de Calidad del Agua Embotellada*. Municipio. Eurofins. Recuperado el 14 de Septiembre de 2022, de [premiumwaters.com-wp-](https://premiumwaters.com-wp-)

content-uploads-2018-05-2021-Byram-CCR-MS-Purified-Water-Spanish\_.pdf

Carbotecnia. ( de de 2022). Recuperado el 20 de Septiembre de 2022, de [www.carbotecnia.info/aprendizaje/quimica-del-agua/significado-de-la-alcalinidad-total-del-agua](http://www.carbotecnia.info/aprendizaje/quimica-del-agua/significado-de-la-alcalinidad-total-del-agua)

Castrejos, B. (22 de Marzo de 2021). *ciencia.unam*. Recuperado el 29 de Septiembre de 2022

Catorce . ( de de 2019). Los diferentes tipos de agua embotellada. *Revista Ambiental Catorce 6*, na. Recuperado el 22 de Septiembre de 2022, de [www.catorce6.com/2-uncategorised/18484-normativa-nacional-respecto-al-coronavirus](http://www.catorce6.com/2-uncategorised/18484-normativa-nacional-respecto-al-coronavirus)

CDC, C. p. ( de de 2022). La Salmonella y los alimentos. *CDC*, 2. Recuperado el 28 de Septiembre de 2022, de <https://www.cdc.gov/foodsafety/es/communication/salmonella-and-food-sp.html>

Departamento de control de calidad del Banco Nacional de ADN, A. (2020). *Programa de control de calidad de ácidos nucleicos*. Universidad de Salamanca, Carlos III, Madrid. Recuperado el 15 de 7 de 2023, de <https://www.bancoadn.org/docs/formulario-control-calidad-muestras.pdf>

Desabad. ( de de 2020). *soriagua.com*. Recuperado el 10 de Septiembre de 2022

Desabad. ( de de 2020). *Soriagua.com*. Recuperado el 11 de Septiembre de 2022, de <https://soriagua.com/botellas-de-agua-diferentes-tipos-de-agua-embotelladas-para-el-consumo-humano>

Ebures, S. (2020). *waterboards*. Recuperado el 21 de Septiembre de 2022, de [www.waterboards.ca.gov-water\\_issues-programs-swamp-docs-cwt-guidance-3130sp.pdf](http://www.waterboards.ca.gov-water_issues-programs-swamp-docs-cwt-guidance-3130sp.pdf)

Edicion Medica. ( de de 2021). *www.edicionmedica*. Recuperado el 10 de Septiembre de 2022, de <http://www.edicionmedica.ec-secciones-salud->

publica-arcsa-y-fiscalia-toman-muestras-e-inician-investigaciones-en-santa-rosa-tras-intoxicacion-masiva.

Elika. ( de de 2021). *seguridadalimentaria.elika*. Recuperado el 12 de Octubre de 2022, de <https://seguridadalimentaria.elika.eus/fichas-de-peligros/listeria/>

Espol. ( de de 2022). *Espol*. Recuperado el 09 de Octubre de 2022, de ceap.espol: <http://www.ceap.espol.edu.ec/es/content/el-consumo-de-agua-embotellada-supera-el-de-bebidas-gaseosas-en-ecuador>

Fernández, M. (Octubre de 2017). *elaguapotable*. Recuperado el 29 de Septiembre de 2022, de <http://www.elaguapotable.com/ozonizacion.htm>

Ferrovial. ( de 2022). *Ferrovial*. Recuperado el 14 de 09 de 2022, de [www.ferrovial.com-es-recursos-osmosis-inversa](http://www.ferrovial.com-es-recursos-osmosis-inversa)

Flores H, H. D. (2017). *Análisis De Indicadores De Contaminación Bacteriológica*. Universidad Científica Del Perú., Facultad De Ciencia E Ingeniería., San Juan Peru. Recuperado el 27 de Septiembre de 2022, de <http://repositorio.ucp.edu.pe/bitstream/handle/UCP/274/SOTIL-1-Trabajo/>

Flowen. (6 de Agosto de 2020). *Flowen*. Recuperado el 29 de Septiembre de 2022, de <https://flowen.com.pe/turbidez-en-el-agua/>

Fuentes et al., R. R. (2015). *Caracterización de la materia orgánica disuelta en agua*. Mexico. Recuperado el 22 de Septiembre de 2022

García, L. ( de de 2021). *ucentral*. Recuperado el 17 de Septiembre de 2021, de [www.ucentral.edu.co/noticentral/biologia-molecular](http://www.ucentral.edu.co/noticentral/biologia-molecular)

German, G. (2022). *Metodos De Siembra*. Universidad Nacional de Río Cuarto, Microbiología. Recuperado el 20 de Noviembre de 2022

Gibbens, S. (12 de Julio de 2022). *Nationalgeographic*. Recuperado el 21 de Octubre de 2022, de <https://www.nationalgeographic.es/medio-ambiente/2019/07/botellas-plastico-dejar-de-ser-seguras-exponen-calor-extremo>

- Gil, M. (2019). *lifeder*. Obtenido de <https://www.lifeder.com/medio-de-cultivo-enriquecido/>
- Gomez, C. (24 de Abril de 2021). *Laboratoriopatvetec* . Recuperado el 29 de Septiembre de 2022, de <https://www.laboratoriopatvetec.com/pseudomonaaeruginosa/>
- Gomez, J., & Torres, J. (2022). *Prevalencia y diversidad genómica de Salmonella enterica recuperada del agua de un río en una importante región agrícola en el noroeste de México*. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD), Laboratorio Nacional para la Investigación en Inocuidad Alimentaria,. Culiacan- Mexico: Javier Garaizar. doi:<https://doi.org/10.3390/microorganisms10061214>
- Gonzalez, M. (2017). *Control microbiológico de Listeria monocytogenes en alimentos para consumo destinado a lactantes*. Universidad de Sevilla, Sevilla., Sevilla. Recuperado el 3 de 08 de 2023, de <http://hdl.handle.net/11441/65117>
- GTAR, G. d. (2022). *Determinación de la materia orgánica*. Escuela Universitaria Politécnica. Universidad de Sevilla., Ambientum, Andalucía-España. Recuperado el 22 de Septiembre de 2022, de [www.ambientum.com/enciclopedia\\_medioambiental/aguas/determinacion\\_materiaorganica.asp](http://www.ambientum.com/enciclopedia_medioambiental/aguas/determinacion_materiaorganica.asp)
- Gutierrez, H. (2008). *Varianza*. Guadalajara, Mexico. Recuperado el 6 de Octubre de 2022
- Hammond, C. (26 de Septiembre de 2015). *BBC*. Recuperado el 29 de Septiembre de 2022, de [https://www.bbc.com/mundo/noticias/2015/09/150918\\_vert\\_fut\\_finde\\_mit\\_o\\_medico\\_agua\\_con\\_gas\\_yv](https://www.bbc.com/mundo/noticias/2015/09/150918_vert_fut_finde_mit_o_medico_agua_con_gas_yv)
- IDEAM, I. d. (2009). Coliformes Totales. *IDEAM*, 2. Recuperado el 25 de Septiembre de 2022, de <http://www.ideam.gov.co/documents/14691/38155/Coliformes+totales+y+E.+coli+en+Agua+Filtracion+por+Membrana.pdf>

- IGME, I. G. (2022). *La molécula de agua*. España, España. Recuperado el 5 de Septiembre de 2022, de [https://www.igme.es/ZonaInfantil/MateDivul/guia\\_didactica](https://www.igme.es/ZonaInfantil/MateDivul/guia_didactica)
- INEN. (Abril de 2017). *Normalizacion*. Recuperado el 14 de Septiembre de 2022, de [www.normalizacion.gob.ec](http://www.normalizacion.gob.ec)
- INTE A50. (2018). *INTECO*. Recuperado el 13 de 9 de 2022, de <https://www.inteco.org/shop/inte-a50-2008-norma-general-para-el-agua-saborizada-ensvasada-y-comercializada-para-consumo-humano-distinta-de-las-aguas-minerales-especificaciones>
- INTECO. (2022). *www.inteco.org*. Recuperado el 12 de 9 de 2022, de [www.inteco.org](http://www.inteco.org)
- ISO 11290-1:2004. (2012). Listeria, Agar Cromogénico. *Cultimed*, 1,2. Recuperado el 22 de Octubre de 2022, de <http://www.ictsl.net/downloads/ultimasmonografias.pdf>
- IVESS. (2022). *somoselagua*. Recuperado el 20 de Septiembre de 2022, de [www.somoselagua.com.ar/blog/hidratacion/que-es-la-alcalinidad-en-el-agua](http://www.somoselagua.com.ar/blog/hidratacion/que-es-la-alcalinidad-en-el-agua)
- JFLAbclinico. (2022). *JFLAbclinico*. Recuperado el Noviembre de 2022, de <https://jflabclinico.wordpress.com/siembra-por-agotamiento-en-estria/>
- Juarez, C. (7 de Mayo de 2020). *thefoodtech*. Recuperado el 29 de Septiembre de 2022, de <https://thefoodtech.com/seguridad-alimentaria/impacto-de-la-contaminacion-por-salmonella/>
- Lablouispasteur. (2018). *lablouispasteur*. Recuperado el 10 de Septiembre de 2022, de <http://lablouispasteur.pe/noticias/laboratorio-de-agua/>
- Liliana, C., Lucía, C., & Diana, M. (04 de Diciembre de 2020). Requerimientos nutricionales y medios de cultivo. *Scielo*, 53. Recuperado el 25 de Septiembre de 2022, de <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v19n36/1794-2470-nova-19-36-49.pdf>

- Llanos, F., & Condo, A. (2022). *Ozonificación en Aguas Embotelladas*. Guaranda. Recuperado el 12 de Octubre de 2022
- Meghdadi, H., & Nassirabady, N. (2019). *Isolation and characterization of Listeria monocytogenes from*. Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Facultad de Microbiología. Bogota: IJM Iranlan Journal. Recuperado el 16 de 7 de 2023, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6462272/pdf/IJM-11-7.pdf>
- Molina, & Pozo, &. (2018). Agua, saneamiento e higiene: medición de los. *Instituto Nacional de Estadística y Censos y UNICEF (INEC-UNICEF)*. Recuperado el 21 de Octubre de 2022
- Monteiro, A. (Diciembre de 2019). *laborclin*. Recuperado el 27 de Noviembre de 2022, de <https://www.laborclin.com.br/wp-content/uploads/2020/02/540195-BIPLACA-SANGRE-AGAR-TSA-2X10mL-10PL.pdf>
- Natalia et al., .. (Septiembre de 2022). Detección de Salmonella Spp. Escherichia coli y Listeria monocytogenes en Atún por PCR Multiplex. *Journal of Aquaculture and Fish Health*, 11(3), 395. doi:DOI : 10.20473/jafh.v11i3.3
- NEUQUEN. (14 de Diciembre de 2021). *Siembra en cajas de Petri por la Técnica de siembra en cuadrantes*. NEUQUEN, Bromatología, Argentina. Recuperado el 23 de Noviembre de 2022, de <https://www.saludneuquen.gob.ar/wp-content/uploads/2021/08/ANAL-005-Microbiologia-general.pdf>
- NEUQUEN. (2021). *Siembras en cajas de Petri por la Técnica de siembra masiva*. NEUQUEN, Argentina. Recuperado el 23 de Noviembre de 2022, de <https://www.saludneuquen.gob.ar/wp-content/uploads/2021/08/ANAL-005-Microbiologia-general.pdf>
- NTE INEN. (Abril de 2017). , INEN, Ecuador. Recuperado el 20 de Septiembre de 2022, de [www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte\\_inen\\_2200-2.pdf](http://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte_inen_2200-2.pdf)

- NTE INEN 2200. (Abril de 2017). *normalizacion.gob.ec*. Recuperado el 20 de Septiembre de 2022, de [www.normalizacion.gob.ec](http://www.normalizacion.gob.ec)
- NTE INEN 2200. (Abril de 2017). *normalizacion.gob.ec*. Recuperado el 29 de Septiembre de 2022, de [https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte\\_inen\\_2200-2.pdf](https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte_inen_2200-2.pdf)
- NTE INEN 2200, I. (2017). *Requisitos Físicos Para El Agua Purificada Envasada Y Agua Purificada*. INEN, Quito. Recuperado el 19 de Septiembre de 2022, de [www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte\\_inen\\_2200-2.pdf](http://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte_inen_2200-2.pdf)
- NTE INEN, 2. (2008). *www.normalizacion.gob.ec*. Recuperado el 10 de Septiembre de 2022
- Núñez, D., & Bayas, F. (2019). *Prevalencia de Salmonella Spp. y Escherichia Coli en agua de consumo humano en Ecuador*. Universidad Estatal de Bolívar , Guaranda-Chimbo. Recuperado el 16 de 7 de 2023, de [https://www.researchgate.net/publication/336141576\\_PREVALENCIA\\_DE\\_SALMONELLA\\_SPP\\_Y\\_ESCHERICHIA\\_COLI\\_EN\\_AGUA\\_DE\\_CONSUMO\\_HUMANO\\_EN\\_ECUADOR](https://www.researchgate.net/publication/336141576_PREVALENCIA_DE_SALMONELLA_SPP_Y_ESCHERICHIA_COLI_EN_AGUA_DE_CONSUMO_HUMANO_EN_ECUADOR)
- Núñez, D., & Bayas, F. (Febrero de 2020). Detection of Salmonella spp. and Listeria spp. in drinking water in Ecuador. *Baltica*, 38,39. Recuperado el 21 de Octubre de 2022
- Ñuñoa, S. ( de de 2018). *insumolab*. Recuperado el 27 de Noviembre de 2022, de [https://www.insumolab.cl/descargas/area\\_clinica/placas\\_90mm/ficha\\_tecnica/10.pdf](https://www.insumolab.cl/descargas/area_clinica/placas_90mm/ficha_tecnica/10.pdf)
- OMS . (20 de Febrero de 2018). Salmonella. *Organizacion Mundial de la Salud*, na. Recuperado el 29 de Septiembre de 2022, de [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal))
- OMS. (2018). *Guías Para La Calidad Del Agua De Consumo Humano* (Vol. 4). Ginebra, Suiza: WHO Graphics. Recuperado el 14 de Septiembre de 2022,

de [apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/272403/9789243549958-spa.pdf?ua=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/272403/9789243549958-spa.pdf?ua=1)

Oppliger, A. (2019). Escasez de agua: develando sus orígenes híbridos en la cuenca del Río Bueno, Chile. *Scielo*. doi:<http://dx.doi.org/10.4067/S0718-34022019000200009>

OPS, O. P. (2022). *OPS*. Recuperado el 24 de Septiembre de 2022, de [https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=10838:2015-peligros-biologicos&Itemid=41432&lang=es#gsc.tab=0](https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10838:2015-peligros-biologicos&Itemid=41432&lang=es#gsc.tab=0)

Organizacion Mundial de la Salud (OMS). ( de de 2018). Recuperado el 2 de Octubre de 2022, de <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/272403/9789243549958-spa.pdf?ua=1>

Peralta, J. (2022). El agua una sustancia. *Academia Mexicana De Ciencias*, na. Recuperado el 5 de septiembre de 2022

Poincare, R. (16 de Julio de 2019). *Sabouraud Agar*. Bio-Rad, Microbiologia, Francia. Recuperado el 28 de Noviembre de 2022, de [https://commerce.bio-rad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/es/56524\\_2019\\_07\\_ES.pdf](https://commerce.bio-rad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/es/56524_2019_07_ES.pdf)

Prieto. (2022). *Mediocplus*. Recuperado el 26 de Noviembre de 2022, de <https://medicoplus.com/ciencia/medios-cultivo-bacterias>

Puga, M. (2021). *guaranda.gob*. Recuperado el 30 de Septiembre de 2022, de <http://www.guaranda.gob.ec/newsiteCMT/la-ciudad/>

Quenta, A. (2020). *Siembra por estría, en tubos de agar inclinado*. Universidad Privada De Tacna Facultad De Ingenieria , Microbiologia , Tacna. Recuperado el 24 de Noviembre de 2022, de <https://www.studocu.com/pe/document/universidad-privada-de-tacna/microbiologia/tipos-de-siembra-microbiologia/9019969>

Ramirez, A. (22 de Junio de 2022). El test PCR como herramienta de diagnóstico. *3tres3*, na. Recuperado el 15 de Septiembre de 2022, de [www.3tres3.com](http://www.3tres3.com)

latam-articulos-test-pcr-como-herramienta de diagnostico-1-2-principios-basicos\_14136

Relief. ( de de 2017). *reliefweb*. Recuperado el 21 de Octubre de 2022

Reynoso. (2 de Junio de 2022). *Siembra en picadura o punción*. Universidad Nacional de Río Cuarto, Microbiología, Cordobesa. Recuperado el 23 de Noviembre de 2022, de [https://espanol.libretexts.org/Biolog%C3%ADa/Microbiolog%C3%ADa/Manual\\_de\\_microbiolog%C3%ADa\\_general/04%3A\\_Metodos\\_de\\_siembra\\_y\\_cultivo\\_de\\_microorganismos/4.02%3A\\_Cultivos\\_en\\_medios\\_solidos](https://espanol.libretexts.org/Biolog%C3%ADa/Microbiolog%C3%ADa/Manual_de_microbiolog%C3%ADa_general/04%3A_Metodos_de_siembra_y_cultivo_de_microorganismos/4.02%3A_Cultivos_en_medios_solidos)

Reynoso, M., & Magnoli, C. (2022). *Cultivos en medios sólidos*. Universidad Nacional de Río Cuarto, Cordoba,Argentina. Recuperado el 22 de Noviembre de 2022, de [https://espanol.libretexts.org/Biolog%C3%ADa/Microbiolog%C3%ADa/Manual\\_de\\_microbiolog%C3%ADa\\_general/04%3A\\_Metodos\\_de\\_siembra\\_y\\_cultivo\\_de\\_microorganismos/4.02%3A\\_Cultivos\\_en\\_medios\\_solidos](https://espanol.libretexts.org/Biolog%C3%ADa/Microbiolog%C3%ADa/Manual_de_microbiolog%C3%ADa_general/04%3A_Metodos_de_siembra_y_cultivo_de_microorganismos/4.02%3A_Cultivos_en_medios_solidos)

Rossi, A. ( de de 2021). *britanialab*. Recuperado el 4 de Noviembre de 2022, de [https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl\\_60709e32e6386.pdf](https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_60709e32e6386.pdf)

Rossy, A. (2021). *Hektoen Entérico Agar*. Britanialab, Caba-Argentina. Recuperado el 27 de Noviembre de 2022, de [https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl\\_6054e9a137b18.pdf](https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_6054e9a137b18.pdf)

Rovira, M. (2022). *microbiologiaparahumanos*. Recuperado el 27 de Noviembre de 2022, de <https://microbiologiaparahumanos.wordpress.com/medios-de-cultivo/>

S.A.S, E. y. (2022). *Equipos y Laboratorio de Colombia S.A.S*. Recuperado el Diciembre de Nobiembre de 2022, de <https://www.equiposylaboratorio.com/portal/articulo-ampliado/tEcnicas-bAsicas-para-el-cultivo-de-microorganismos:-siembra-y-estudio-de-bacterias>

- Sánchez. (2019). *Alcalinidad en el agua*. Universidad Técnica De Ambato, Laboratorio Clínico, Ambato. Recuperado el 20 de Septiembre de 2022
- Sánchez, M., & Pilco, M. (2019). *Calidad Microbiológica De Las Aguas Embotelladas En Frascos*. Universidad Técnica De Ambato, Ambato. Recuperado el 19 de Septiembre de 2022, de [repositorio.uta.edu.ec](https://repositorio.uta.edu.ec)
- Sanchez, R. (2019). *CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LAS AGUAS EMBOTELLADAS EN FRASCOS*. UTA, FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD , Ambato. Recuperado el 19 de 10 de 2023, de <https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/29296/2/S%C3%A1nc%20Pilco%20M%C3%B3nica%20Raquel.pdf>
- Serviqualita. (Agosto de A de 2017). *serviqualita.es*. Recuperado el 20 de Septiembre de 2022, de [serviqualita.es/index.php/inicio/blog/item/150-densidad-del-agua](https://serviqualita.es/index.php/inicio/blog/item/150-densidad-del-agua)
- Swistock, B. (19 de Octubre de 2020). Bacterias Coliformes. *PennState Extension*, na. Recuperado el 26 de Septiembre de 2022, de <https://extension.psu.edu/bacterias-coliformes/>
- Swistock, B. (5 de Septiembre de 2023). Protéjase de las Bacterias Coliformes en el Agua de su Pozo. *College of Agricultural Sciences*. Recuperado el 12 de Octubre de 2023, de <https://extension.psu.edu/bacterias-coliformes#:~:text=La%20presencia%20de%20coliformes%20en,y%20el%20suministro%20de%20agua>.
- Thermofisher. (2021). *thermofisher*. Recuperado el 25 de Noviembre de 2022, de <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/CM1084B>
- Torres, P. (Mayo de 2018). Agua Embotellada. *Readers Digest*, na. Recuperado el 6 de 9 de 2022, de [//www.rd.com/special-reports/the-environment/rethink-what-you-drink/article.html](https://www.rd.com/special-reports/the-environment/rethink-what-you-drink/article.html)
- Truque. (2018). *Armonización De Los Estándares De Agua*. OAS, Bogotá. Recuperado el 14 de Septiembre de 2022, de [www.oas.org-publications-classifications-Armoniz.EstandaresAguaPotable](http://www.oas.org-publications-classifications-Armoniz.EstandaresAguaPotable).

- Truque. (2019). *Armonización De Los Estándares De Agua Potable En Las Aguas*. Bogotá, Colombia. Recuperado el 18 de Septiembre de 2022
- UEB, E. M. (2 de Marzo de 2021). Recuperado el 30 de Septiembre de 2022
- Urda, A. (2018). *Detección Molecular De Comunidades Microbianas En Agua*. Universidad De Córdoba, Facultad Ciencias De La Salud Programa De Bacteriología, Colombia. Recuperado el 29 de Septiembre de 2022, de <https://repositorio.unicordoba.edu.co/bitstream/handle/ucordoba/>
- Uriarte, J. M. ( de de 2020). *Características*. Recuperado el 25 de Septiembre de 2022, de <https://www.caracteristicas.co/microorganismos/>
- Valdes, R. (2021). *Agar Xilosa - Lisina - Desoxicolato*. VALTEK S.A, Santiago de Chile. Recuperado el 24 de Noviembre de 2022, de <https://www.valtek.cl/wp-content/uploads/2020/02/Agar-XLD-Valtek-Version-3.pdf>
- Valdivieso, A. (Septiembre de 2022). *Iagua*. Recuperado el 14 de Septiembre de 2022, de [www.iagua.es-respuestas-que-es-agua-ozonizada-suspendidos](http://www.iagua.es-respuestas-que-es-agua-ozonizada-suspendidos).
- Vazquez, M. (2022). Infecciones por Escherichia coli. *Charles E. Schmidt College of Medicine*, 3. Recuperado el 4 de Agosto de 2023, de <https://www.msmanuals.com/es-mx/professional/enfermedades-infecciosas/bacilos-gramnegativos/infecciones-por-escherichia-coli#:~:text=%3A%20estas%20cepas%20%28entre%20ellas%20el%20serotipo%20O157%3AH7,los%20casos%2C%20se%20desarrolla%20un%20s%C3%ADndrome%>
- Villa, M. (2022). *utpl.edu.ec*. Recuperado el de de 2022, de [utpl.edu.ec/carreras/calidad-del-agua](http://utpl.edu.ec/carreras/calidad-del-agua)
- Viresa. ( de de 2021). Obtenido de [https://viresa.com.mx/blog\\_tipos\\_medios\\_cultivo](https://viresa.com.mx/blog_tipos_medios_cultivo)
- Waterlogic. ( de de 2019). *Qué contiene el agua embotellada*. Recuperado el 9 de Septiembre de 2022, de [www.waterlogic.es/blog-sabes-lo-que-puedes-encontrar-en-el-agua-embotellada](http://www.waterlogic.es/blog-sabes-lo-que-puedes-encontrar-en-el-agua-embotellada)

Winkler, L. D. ( de Septiembre de 2020). *Winkler*. Recuperado el 24 de Noviembre de , de <https://winklerltda.cl/quimicav2/wp-content/uploads/FTmicrobiologia/638091-FT.pdf>

Zarza, L. (2022). *iagua.es*. Recuperado el 20 de Septiembre de 2022, de [www.iagua.es-respuestas/cual-es-densidad-agua](http://www.iagua.es-respuestas/cual-es-densidad-agua)

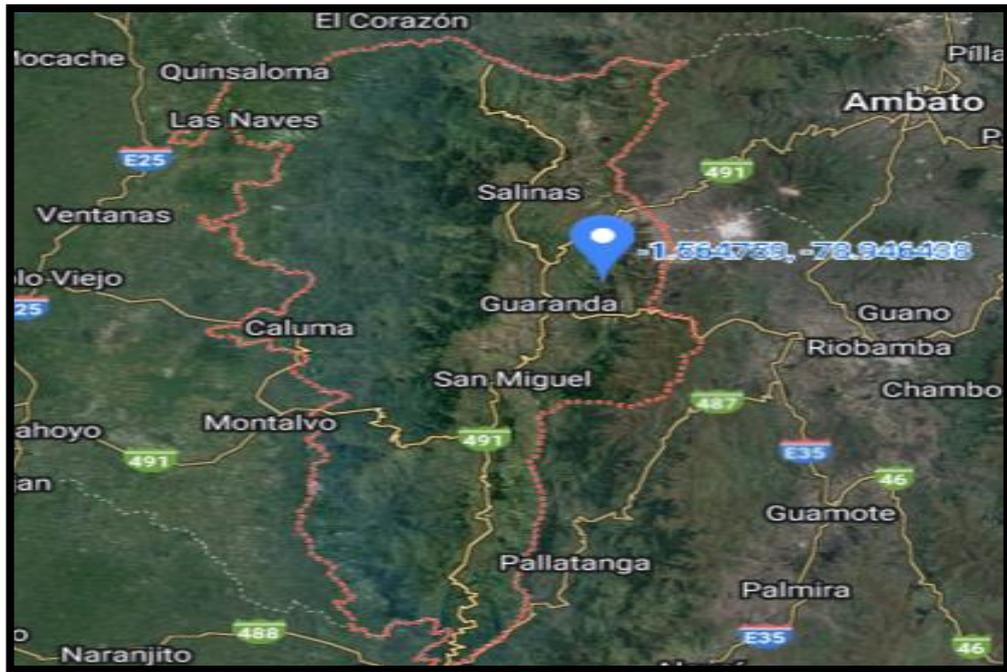
Zix, a. ( de de 2021). *bbzix*. Recuperado el 20 de Septiembre de 2022, de [www.bbzix.com/caracteristicas-fisico-quimicas-del-agua-dureza](http://www.bbzix.com/caracteristicas-fisico-quimicas-del-agua-dureza)

## 7. ANEXOS.

### Anexo 1

*Mapa de ubicación de la investigación*





## Anexo 2

### *Cronograma de actividades*

Actividades	Meses								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Elaboración del proyecto	x								
Presentación del proyecto	x								
Aprobación del proyecto		x							
Defensa del proyecto		x							
Instalación y manejo del experimento			x	x	x	X			
Seguimiento y evaluación				X	x	x			
Visita del tribunal						X			
Análisis e interpretación						x	X		
Elaboración del borrador final							x		
Pre defensa								x	
Defensa final									x

**Anexo 3.***Presupuesto*

<b>Costos de producción</b>				
<b>Detalle</b>	<b>Unidad</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Valor unitario \$</b>	<b>Valor parcial \$</b>
<b>Materias primas</b>				
Agua 1	Mililitros	1	0.50	2.00
Agua 2	Mililitros	1	0.50	2.00
Agua 3	Mililitros	1	0.50	2.00
Agua 4	Mililitros	1	0.50	2.00
Agua 5	Mililitros	1	0.50	2.00
Agua 6	Mililitros	1	0.50	2.00
Agua 7	Mililitros	1	0.50	2.00
Agua 8	Mililitros	1	0.50	2.00
Agua 9	Mililitros	1	0.50	2.00
Agua 10	Mililitros	1	0.50	2.00
Agua 11	Mililitros	1	0.50	2.00
Agua 12	Mililitros	1	0.50	2.00
Agua 13	Mililitros	1	0.50	2.00
Agua 14	Mililitros	1	0.50	2.00
Agua 15	Mililitros	1	0.50	2.00
Agua 16	Mililitros	1	0.50	2.00
Agua 17	Mililitros	1	0.50	2.00
<b>MATERIALES DE OFICINA Y SUMINISTROS</b>				
Cuadernos	Unidades	2	10	24.55
Esferos	Unidades	10	4	20.44
Lápices	Unidades	5	3	10.43
Hojas A4	Unidades	1	4	30.65
Calculadora	Unidades	2	40	60.45
Portafolio	Unidades	1	3.50	13.55

Flash	Unidades	1	7	18.43
<b>Reactivos</b>				
Agar MacConkey	Gramos	1	34.45	80.23
Lugol	Mililitros	1	23.55	30.00
Alcohol	Mililitros	4	5.66	20.00
Acetona	Mililitros	1	4.66	20.00
Safranina	Mililitros	1	18.19	25.00
<b>Insumos</b>				
Envases de vidrio	Mililitros	20	34.89	50.00
Papel aluminio	Unidades	10	8.98	20.00
Cajas Petri	Unidades	24	55.00	100.00
<b>Análisis de laboratorio (Microbiología)</b>				
<i>E. coli</i>	Unidad	1	20.24	80.00
Salmonella	Unidad	1	21.78	82.78
<i>Listeria</i>	Unidad	1	22.68	88.68
<b>Análisis biomoleculares</b>				
PCR	Unidad	1	1000	1500.00
Electroforesis	Unidad	1	100	100.00
<b>Costo total</b>				2.403,19 \$

**Anexo 4**

*Formatos de fichas de recolección de datos.*

<b>UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLÍVAR</b>					
<b>FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS RECURSOS NATURALES Y DEL AMBIENTE</b>					
<b>CARRERA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL</b>					
<b>Ficha De Recolección De Datos</b>					
<b>Código</b>	<b>Lugar de origen</b>	<b>Contenido neto</b>	<b>Cantón de muestreo</b>	<b>Hora y Fecha</b>	<b>Marca</b>
<b>T1</b>					
<b>T2</b>					
<b>T3</b>					
<b>T4</b>					
<b>T5</b>					
<b>T6</b>					
<b>T7</b>					
<b>T8</b>					
<b>T9</b>					
<b>T10</b>					
<b>T11</b>					
<b>T12</b>					
<b>T13</b>					
<b>T14</b>					

## Anexo 5

### Análisis microbiológicos

 <b>DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN Y VINCULACIÓN</b>	<b>LABORATORIOS DE INVESTIGACIÓN Y VINCULACIÓN</b> <small>Lagunacoto II, Km. 1 1/2, vía a San Simón, Cantón Guaranda, Provincia Bolívar, Ecuador.</small>	Código	IR-PMA
		Versión	1
	<b>INFORME DE RESULTADOS</b>	Año	2023
		Página	Página 1 de 6

INFORME N.º 194

DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA					
Solicitante	Andrés Llanos – Ángel Condo				
Muestra	Agua				
Código asignado UEB	INV174, INV175, INV191, INV192, INV390 – INV 418				
Estado de la muestra	Líquida				
Envase de recepción	Botella plástica				
Análisis requerido(s)	<i>Listeria, Salmonella, E. coli</i>				
Fecha de recepción	12 de abril, 10 de mayo y 1 de julio de 2023				
Fecha de análisis	12 de abril – 15 de junio de 2023				
Fecha de informe	27 de julio de 2023				
Técnico (s) asignado	RCMR				
RESULTADOS OBTENIDOS					
Código de laboratorio	Muestra	Análisis	Método de análisis	Unidad	Resultado
INV 174	Agua	Listeria	ISO 9001-2015	UFC/100 mL	135
INV 175	Agua	Listeria	ISO 9001-2015	UFC/100 mL	60
INV 191	Agua	Listeria	ISO 9001-2015	UFC/100 mL	35
INV 192	Agua	Listeria	ISO 9001-2015	UFC/100 mL	14
INV 390	Agua	Listeria	ISO 9001-2015	UFC/100 mL	6
INV 391	Agua	Listeria	ISO 9001-2015	UFC/100 mL	6
INV 392	Agua	Listeria	ISO 9001-2015	UFC/100 mL	14
INV 393	Agua	Listeria	ISO 9001-2015	UFC/100 mL	0
INV 394	Agua	Listeria	ISO 9001-2015	UFC/100 mL	0
INV 395	Agua	Listeria	ISO 9001-2015	UFC/100 mL	0
INV 396	Agua	Listeria	ISO 9001-2015	UFC/100 mL	0
INV 397	Agua	Listeria	ISO 9001-2015	UFC/100 mL	0

 <b>DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN Y VINCULACIÓN</b>	<b>LABORATORIOS DE INVESTIGACIÓN Y VINCULACIÓN</b> <small>Lagunillas II Km 1 1/2, vía a San Cayetano, Cantón Guaranda, Provincia Bolívar, Ecuador</small>		Código	IR-PMA
			Versión	1
	<b>INFORME DE RESULTADOS</b>		Año	2023
			Página	Página 2 de 6

INV 398	Agua	Listeria	ISO 9001-2015	UFC/100 mL	0
INV 399	Agua	Listeria	ISO 9001-2015	UFC/100 mL	0
INV 400	Agua	Listeria	ISO 9001-2015	UFC/100 mL	0
INV 401	Agua	Listeria	ISO 9001-2015	UFC/100 mL	0
INV 402	Agua	Listeria	ISO 9001-2015	UFC/100 mL	0
INV 403	Agua	Listeria	ISO 9001-2015	UFC/100 mL	0
INV 404	Agua	Listeria	ISO 9001-2015	UFC/100 mL	12
INV 405	Agua	Listeria	ISO 9001-2015	UFC/100 mL	9
INV 406	Agua	Listeria	ISO 9001-2015	UFC/100 mL	10
INV 407	Agua	Listeria	ISO 9001-2015	UFC/100 mL	35
INV 408	Agua	Listeria	ISO 9001-2015	UFC/100 mL	24
INV 409	Agua	Listeria	ISO 9001-2015	UFC/100 mL	18
INV 410	Agua	Listeria	ISO 9001-2015	UFC/100 mL	76
INV 411	Agua	Listeria	ISO 9001-2015	UFC/100 mL	26
INV 412	Agua	Listeria	ISO 9001-2015	UFC/100 mL	22
INV 413	Agua	Listeria	ISO 9001-2015	UFC/100 mL	0
INV 414	Agua	Listeria	ISO 9001-2015	UFC/100 mL	0
INV 415	Agua	Listeria	ISO 9001-2015	UFC/100 mL	0
INV 416	Agua	Listeria	ISO 9001-2015	UFC/100 mL	13
INV 417	Agua	Listeria	ISO 9001-2015	UFC/100 mL	17
INV 418	Agua	Listeria	ISO 9001-2015	UFC/100 mL	9

 <b>UNIVERSIDAD</b> <small>ESTADAL DE BOLÍVAR</small>	<b>DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN Y VINCULACIÓN</b>	<b>LABORATORIOS DE INVESTIGACIÓN Y VINCULACIÓN</b> <small>Leguistola II, Km. 1 PZ, s/n a San Simón, Cantón Guaranda, Provincia Bolívar, Ecuador.</small>		<b>Código</b>	IR-PMA
		<b>INFORME DE RESULTADOS</b>		<b>Versión</b>	1
				<b>Año</b>	2023
				<b>Página</b>	Página 4 de 6

INV 407	Agua	Salmonella	ISO 19250:2013	UFC/100 mL	0
INV 408	Agua	Salmonella	ISO 19250:2013	UFC/100 mL	0
INV 409	Agua	Salmonella	ISO 19250:2013	UFC/100 mL	0
INV 410	Agua	Salmonella	ISO 19250:2013	UFC/100 mL	0
INV 411	Agua	Salmonella	ISO 19250:2013	UFC/100 mL	0
INV 412	Agua	Salmonella	ISO 19250:2013	UFC/100 mL	0
INV 413	Agua	Salmonella	ISO 19250:2013	UFC/100 mL	0
INV 414	Agua	Salmonella	ISO 19250:2013	UFC/100 mL	0
INV 415	Agua	Salmonella	ISO 19250:2013	UFC/100 mL	0
INV 416	Agua	Salmonella	ISO 19250:2013	UFC/100 mL	57
INV 417	Agua	Salmonella	ISO 19250:2013	UFC/100 mL	24
INV 418	Agua	Salmonella	ISO 19250:2013	UFC/100 mL	16
INV 174	Agua	E. coli	NTE INEN-ISO 9308-1	UFC/100 mL	53
INV 175	Agua	E. coli	NTE INEN-ISO 9308-1	UFC/100 mL	24
INV 191	Agua	E. coli	NTE INEN-ISO 9308-1	UFC/100 mL	15
INV 192	Agua	E. coli	NTE INEN-ISO 9308-1	UFC/100 mL	0
INV 390	Agua	E. coli	NTE INEN-ISO 9308-1	UFC/100 mL	0
INV 391	Agua	E. coli	NTE INEN-ISO 9308-1	UFC/100 mL	0
INV 392	Agua	E. coli	NTE INEN-ISO 9308-1	UFC/100 mL	0
INV 393	Agua	E. coli	NTE INEN-ISO 9308-1	UFC/100 mL	0
INV 394	Agua	E. coli	NTE INEN-ISO 9308-1	UFC/100 mL	0

 <b>UNIVERSIDAD</b> ESTADAL DE BOLIVAR	<b>DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN Y VINCULACIÓN</b>	<b>LABORATORIOS DE INVESTIGACIÓN Y VINCULACIÓN</b> <small>Lagunacola II, Km 1 1/2 v/a a San Simón, Cantón Guaranda, Provincia Bolívar, Ecuador.</small>		<b>Código</b>	IR-PMA
		<b>INFORME DE RESULTADOS</b>		<b>Versión</b>	1
				<b>Año</b>	2023
				<b>Página</b>	Página 6 de 6

INV 416	Agua	E. coli	NTE INEN-ISO 9308-1	UFC/100 mL	16
INV 417	Agua	E. coli	NTE INEN-ISO 9308-1	UFC/100 mL	12
INV 418	Agua	E. coli	NTE INEN-ISO 9308-1	UFC/100 mL	10

Los resultados son expresados como media de tres replicas  $\pm$  DE.



Ing. Favian Bayas, Ph.D  
 Director de Investigación y Vinculación

## Anexo 6

### Georreferenciación

**Cantón San Miguel, Empresa embotelladora BEBACUA.**



**San José de Chimbo, Empresa embotelladora AQUA PURITECH.**



**Guaranda, Empresa embotelladora Aqua Santa, Parroquia Santa Fe**



## Anexo 5

### Análisis físico-químicos

#### DQO, Demanda Química De Oxígeno

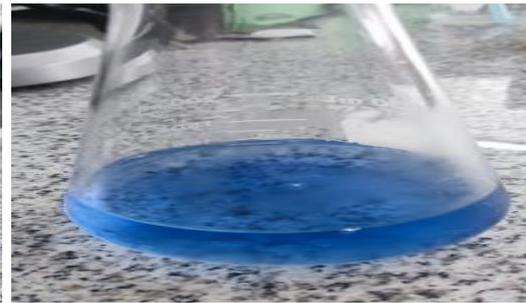
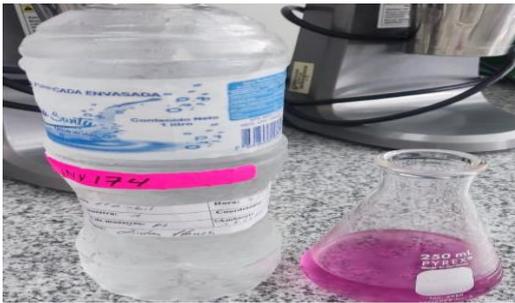
Digestor de DQO



Espectrofotómetro HACH



#### Dureza



#### Turbiedad



#### Medidor de pH



## Anexo 6

### Análisis microbiológicos

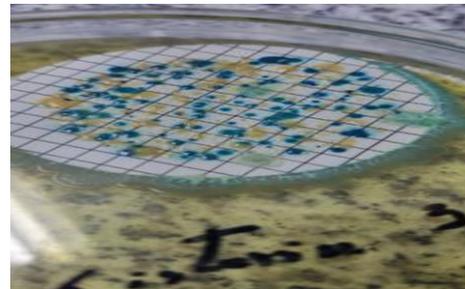
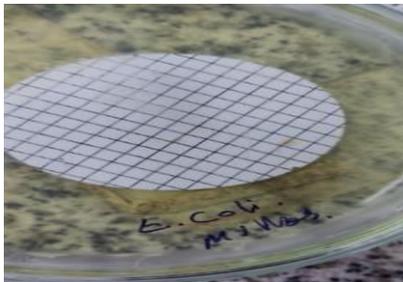
#### Preparación de medios de cultivo selectivos



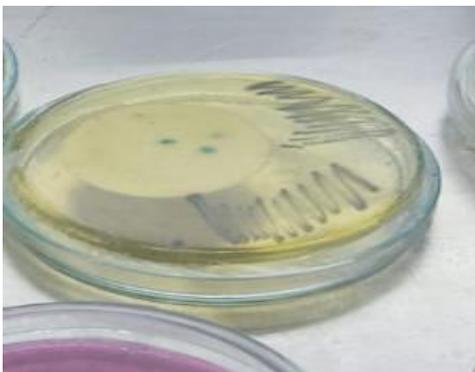
#### Filtración de muestras mediante membrana y siembra en medios selectivos



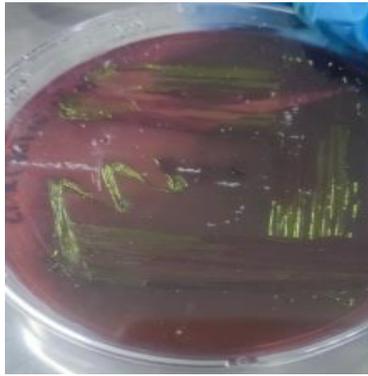
Lectura de muestras



XLD-Samonella



Agar EMB levine-*E.coli*



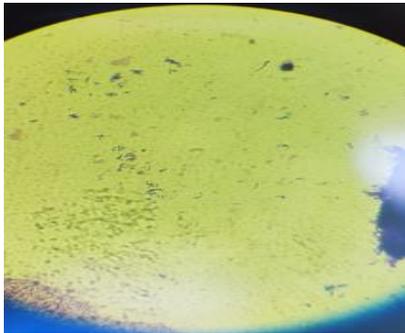
Agar Chromogenic *Listeria*



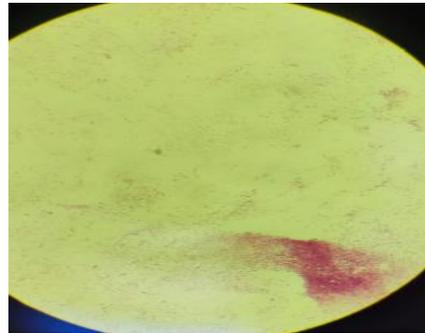
**Tincion de gram**



Bacilos (+) *Listeria*



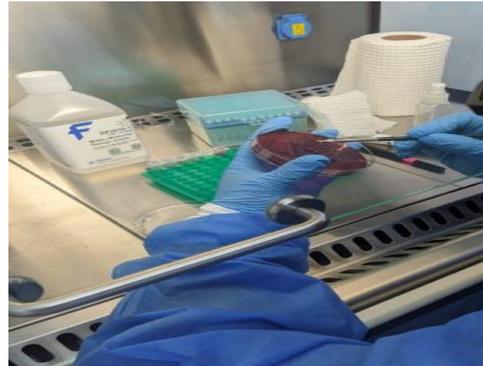
Bacilos (-) *E.coli*



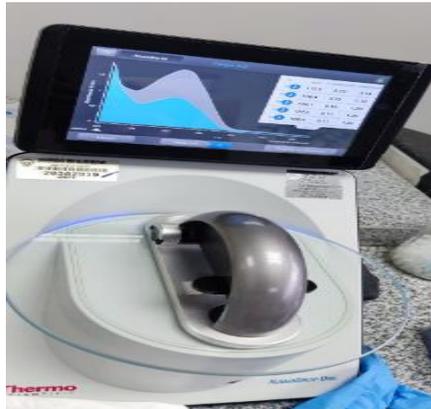
## Anexo 7

### *Extracción de ADN mediante mini kit y electroforesis*

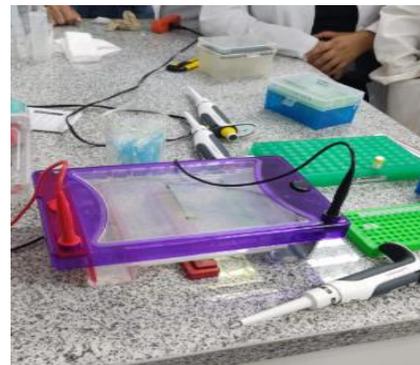
#### Extracción de ADN mediante mini kit

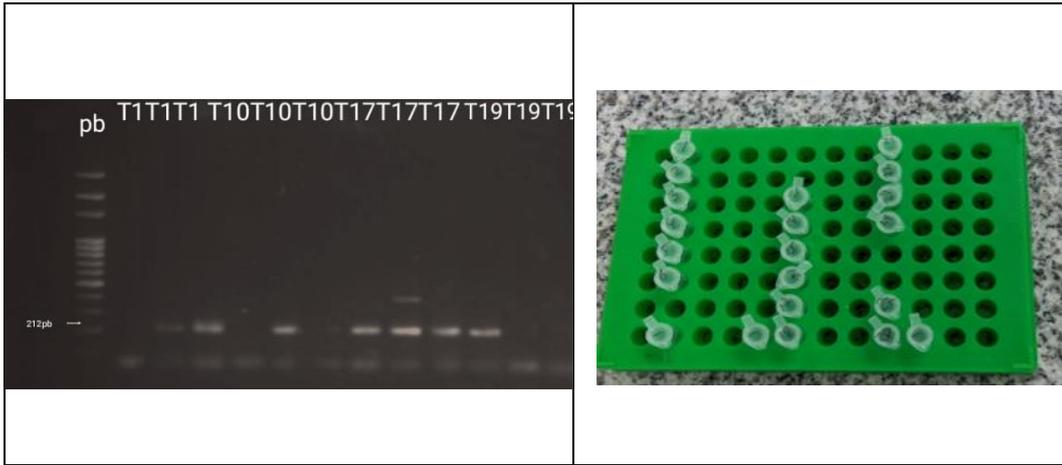


#### Lectura de ADN en Nanodrop



**Amplificación de ADN extraído**





## 7.6. Glosario de términos Técnicos

**Electroforesis:** Es una técnica utilizada para la separación de moléculas según su campo eléctrico.

**Indol:** Compuesto heterocíclico que es de categoría orgánica que indica la presencia de triptofanasa en reacción con el triptófano.

**Medios de cultivo:** componentes que crean condiciones necesarias para el desarrollo de los diferentes patógenos existentes en diferentes alimentos y otros.

**M.O:** Microorganismo.

**FDA:** Administración de alimentos y medicamentos.

**UFC:** Unidades formadoras de colonia.

**Cepas:** es denominada como la población de células de una sola especie descendientes de una sola u única célula.

**Estría:** es un material de laboratorio el cual es el encargado de aislar las cepas en las placas petri a partir de una muestra que puede estar contaminada.