



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

¿Qué hay realmente en tu botella? Un análisis biomolecular.

Darwin Núñez Torres
Sandra Iza Iza
Herminia Sanaguano Salguero
Carlos Moreno Mejía

ISBN: 978-9907-0-0501-1

2025



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

AUTORES:

DARWIN ALBERTO NÚÑEZ TORRES

SANDRA PATRICIA IZA IZA

HERMINIA DEL ROSARIO SANAGUANO SALGUERO

CARLOS ROBERTO MORENO MEJÍA



Este libro ha sido debidamente examinado y valorado en la modalidad doble par ciego con fin de garantizar la calidad científica.

©Grupo Editorial BLR
Universidad Estatal de Bolívar
Riobamba – Ecuador
Correo: publicaciones@grupobl.com
<https://grupobl.com/libros-investig>
REPOSITORIO



Núñez, D., Iza, S., Sanaguano, H., Moreno, C. (2025) La calidad del agua embotellada en la provincia bolívar a través de análisis biomoleculares (pcr) y cultivos microbiológicos. Grupo Editorial BLR.

© Darwin Alberto Núñez Torres
Sandra Patricia Iza Iza
Herminia del Rosario Sanaguano Salguero
Carlos Roberto Moreno Mejía

ISBN:978-9907-0-0501-1

El copyright promueve la libertad de expresión, protege la diversidad de ideas y conocimiento, además apoya la libre expresión. Se prohíbe de manera rigurosa la producción o el almacenamiento de esta publicación, ya sea en su totalidad o en parte, está estrictamente prohibido por ley, incluyendo el diseño de la portada, así como su difusión a través de cualquiera de sus medios, ya sean electrónicos, mecánicos, ópticos, de grabación o incluso de fotocopia, sin permiso de los propietarios de los derechos de autor.

FILIACIONES DE LOS AUTORES

Darwin Alberto Núñez Torres

Universidad Estatal de Bolívar

Correo Electrónico: danunez@ueb.edu.ec

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0338-3759>

Sandra Patricia Iza Iza

Universidad Estatal de Bolívar

Correo Electrónico: siza@ueb.edu.ec

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5388-7862>

Herminia del Rosario Sanaguano Salguero

Universidad Estatal de Bolívar

Correo Electrónico: hsanaguano@ueb.edu.ec

ORCID: <https://orcid.org/0009-0009-9754-6328>

Carlos Roberto Moreno Mejía

Universidad Estatal de Bolívar

Correo Electrónico: cmoreno@ueb.edu.ec

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0238-6886>



ÍNDICE

ÍNDICE.....	i
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
RESUMEN	xiv
ABSTRACT	xv
INTRODUCCIÓN.....	i
PROBLEMA	iii
Hipótesis nula (H_0)	v
Hipótesis Alternativa (H_1).....	v
CAPÍTULO I	44
1 MARCO TEÓRICO.....	44
1.1 Agua.....	44
1.1.1 Agua embotellada	44
1.1.2 Calidad del agua	45
1.1.3 Estándares de calidad para el agua envasada.....	49
1.1.4 Tipos de agua embotellada	50
1.1.5 Clasificación del agua embotellada	51
1.1.6 Regulaciones para el agua embotellada	56
1.1.7 Requisitos sanitarios de los procesadoras de agua	57
1.2 Embotelladoras de agua en la provincia Bolívar	58

1.3	Biología molecular.....	60
1.3.1	Análisis Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en aguas	
	61	
1.3.2	Electroforesis	62
1.3.3	Microbiología del agua	62
1.3.4	Microorganismos	63
1.3.5	Bacterias	63
1.3.6	Escherichia Coli.....	65
1.3.7	Listeria	67
1.4	Tipos de cultivo	69
1.4.1	Cultivo puro oxénico.....	70
1.4.2	Cultivo mixto	70
1.5	Técnicas de cultivo en placa	70
1.5.1	Técnica por estría en superficie	70
1.5.2	Técnica de siembra para aislamiento por estría múltiple.....	71
1.5.3	Técnica de cuatro cuadrantes	72
1.5.4	Técnica por agotamiento o en superficie	72
1.5.5	Técnica de siembra masiva	73
1.5.6	Técnica de siembra por punción	74
1.5.7	Técnica de siembra por dilución.....	74
1.6	Técnicas de siembra para tubos	75
1.6.1	Siembra en tubos por estría simple	75

1.6.2	Siembra en tubos por picadura	76
1.6.3	Siembra mixta en tubos	77
1.6.4	Siembra por inoculación o agitación	77
1.7	Tipos de medio de cultivo según su función	78
1.7.1	Medio general	78
1.7.2	Medio selectivo.....	78
1.7.3	Medio diferencial.....	79
1.7.4	Medio de enriquecimiento o nutritivo	79
1.7.5	Medio mínimo	79
1.8	Tipos de agar.....	79
1.8.1	Agar/Caldo LB (Luria Bertani) o Agar caldo Millers LB	80
1.8.2	Agar sangre.....	80
1.8.3	Agar chocolate	80
1.8.4	Agar MacConkey	81
1.8.5	Agar sabouraud.....	81
1.8.6	Agar entérico de hektoen	81
1.8.7	Agar Müller -Hinton	82
1.8.8	Agar Xilosa -Lisina-Desoxicolato (XLD)	82
1.8.9	Agar verde brillante	82
1.8.10	Agar triptona -soja (TSA).....	83
1.8.11	Listeria agar cromogénico	83
CAPÍTULO II.....		85

2	MARCO METODOLÓGICO.....	85
2.1	Localización de la investigación.....	85
2.1.1	Situación geográfica y climática.....	86
2.1.2	Zona de vida	86
2.2	Materiales	87
2.2.1	Material experimental.....	87
2.2.2	Materiales de oficina.....	87
2.2.3	Materiales de laboratorio	88
2.2.4	Equipos	89
2.3	Métodos	90
2.3.1	Factores en estudio	90
2.3.2	Tratamientos	91
2.3.3	Características del experimento	92
2.3.4	Tipo diseño experimental o estadístico.....	93
2.4	Métodos de evaluación y datos a tomarse	94
2.4.1	Variable de respuesta	94
2.5	Georreferenciación	95
2.5.1	Recolección de datos	95
2.6	Manejo del experimento	96
2.6.1	Obtención de muestras.....	96
2.6.2	Codificación e identificación de las muestras	96
2.6.3	Registro de las muestras	96

2.7	Análisis Microbiológicos	99
2.7.1	Aislamiento de E. Coli.....	99
2.7.2	Aislamiento de Listeria.....	100
2.7.3	Aislamiento de Salmonella	102
2.7.4	Tinción de Gram	103
2.8	Análisis Molecular (PCR) Reacción en cadena de la polimerasa 104	
2.9	Tabulación	109
CAPÍTULO III		110
3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	110
3.1	Resultados de georreferenciación con coordenadas mediante GPS	110
3.2	Resultados microbiológicos.....	114
3.2.1	Cuantificación de Listeria de las muestras de agua embotellada de las diferentes empresas que existen en la provincia Bolívar.....	114
3.2.2	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	117
3.2.3	Cuantificación de E. coli de las muestras de agua embotellada de las diferentes empresas	121
3.2.4	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	124
3.2.5 Cuantificación de Salmonella de las muestras de agua embotellada de las diferentes empresas	128
3.2.6 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	131
3.2.7 Identificación de Listeria monocytogenes, Salmonella spp. y Escherichia coli mediante Reacción de Cadena Polimerasa (PCR)	134
3.2.8 Concentración y calidad de ADN extraída mediante Genomic DNA Mini kit k182001	135
3.3 Análisis molecular	139
3.3.1 Detección de Listeria monocytogenes mediante reacción de cadena de polimerasa (PCR)	139
3.3.2 Detección de Escherichia coli mediante reacción de cadena de polimerasa (PCR)	141
3.3.3 Detección de Salmonella spp. mediante reacción de cadena de polimerasa (PCR)	142
3.3.4 Frecuencias y porcentajes para casos positivos	147
3.4 Comprobación de la hipótesis	150
3.4.1 Hipótesis nula (H0)	150
3.4.2 Hipótesis Alternativa (H1)	150

3.4.3 Verificación de hipótesis	151
CAPÍTULO IV.....	152
4 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	152
4.1 Conclusiones.....	152
4.2 Recomendaciones	153
GLOSARIO.....	155
BIBLIOGRAFÍA	155
ANEXOS	171

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Requisitos físicos para el agua purificada.	46
Tabla 2. Requisitos microbiológicos.	47
Tabla 3. Clasificación Taxonómica de <i>Escherichia coli</i>	65
Tabla 4. Requisitos microbiológicos para el agua purificada envasada y el agua purificada mineralizada envasada.	66
Tabla 5. Taxonomía de <i>Listeria monocytogenes</i>	67
Tabla 6. Taxonomía salmonella.	68
Tabla 7. Aspectos generales del territorio.	85
Tabla 8. Datos de la situación climática y geográfica.	86
Tabla 9. Factores de estudio.	91
Tabla 10. Tratamientos.	92
Tabla 11. Características del diseño.	93
Tabla 12. Modelo de Análisis de varianza ANOVA.	94
Tabla 13. Codificación, identificación registro de las muestras y origen.	97
Tabla 14. Cebadores específicos utilizados en esta investigación...	106
Tabla 15. Reactivos PCR para <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella spp.</i>	107

Tabla 16. Condiciones para el proceso de (PCR) para <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> spp.	107
Tabla 17. Resultados de georreferenciación con coordenadas mediante GPS.	110
Tabla 18. Valores obtenidos mediante resultados microbiológicos del primer, segundo y tercer muestreo.	114
Tabla 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.....	117
Tabla 20. Anova para <i>Listeria</i>	118
Tabla 21. Pruebas de Múltiple Rangos para <i>Listeria</i> por el método de Tukey HSD.	119
Tabla 22. Valores obtenidos mediante resultados microbiológicos del primer y segundo muestreo.	121
Tabla 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.....	124
Tabla 24. Anova <i>Escherichia coli</i>	125
Tabla 25. Pruebas de Múltiple Rangos para <i>Escherichia coli</i> por el método de Tukey HSD.....	126

Tabla 26. Valores obtenidos mediante resultados microbiológicos del primer y segundo muestreo.	128
Tabla 27. Identificación y diferenciación microscópica mediante tinción de gram de las colonias aisladas de <i>Salmonella</i> spp. de las muestras de agua purificada embotellada.	131
Tabla 28. Anova para <i>Salmonella</i> spp.	131
Tabla 29. Pruebas de Múltiple Rangos para <i>Salmonella</i> por el método de Tukey HSD.	132
Tabla 30. Concentración de ADN mediante Espectrofotómetro Nanodrop para <i>Listeria monocytogenes</i>	135
Tabla 31. Concentración de ADN mediante Espectrofotómetro Nanodrop para <i>Escherichia coli</i>	137
Tabla 32. Concentración de ADN mediante Espectrofotómetro Nanodrop para <i>Salmonella</i>	138
Tabla 33. Resultados de ADN extraído y analizado mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de <i>Listeria monocytogenes</i>	144
Tabla 34. Resultados de ADN extraído y analizado mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de <i>Escherichia coli</i>	145
Tabla 35. Resultados de ADN extraído y analizado mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de <i>Salmonella</i> spp.	146

Tabla 36. Tabla de frecuencias y porcentajes para casos positivos de Listeria monocytogenes por PCR.....	147
Tabla 37. Tabla de frecuencias y porcentajes para casos positivos de Escherichia coli.	148
Tabla 38. Tabla de frecuencias y porcentajes para casos positivos de Salmonella spp.	148

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del agua.....	44
Figura 2. Calidad del agua.....	49
Figura 3. Tipos de agua embotellada.....	51
Figura 4. Agua gasificada.....	53
Figura 5. Cámara de ozono para el agua.	55
Figura 6. Esquema del Mecanismo PCR.....	62
Figura 7. Bacterias presentes en el agua.....	64
Figura 8. Georreferenciación de las empresas embotelladoras de agua en la Provincia Bolívar.	113
Figura 9. Medias de los porcentajes de Listeria.	120
Figura 10. Medias de los porcentajes de Escherichia coli.....	127
Figura 11. Medias de los porcentajes de Salmonella spp.....	134
Figura 12. 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.	140
Figura 13. Resultados de electroforesis después de realizar PCR con los aislados de Escherichia coli donde pb es el marcador de	

peso molecular E+ es el blanco positivo y T son las muestras de ADN..... 142

Figura 14. 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..... 143

RESUMEN

El proyecto investigativo titulado “La calidad del agua embotellada en la provincia Bolívar a través de análisis biomoleculares (PCR) y cultivos microbiológicos” tuvo como finalidad analizar la calidad microbiológica del agua embotellada producida por diferentes empresas de la provincia mediante dos metodologías complementarias: medios de cultivo específicos para el desarrollo de microorganismos y técnicas de biología molecular (PCR en tiempo final). Se planteó un diseño completamente al azar (DCA) con arreglo factorial A x B (5 x 2) y tres repeticiones, evaluándose un total de 11 marcas de agua embotellada mediante cultivos selectivos y diferenciales expresados en UFC/mL, además de cebadores específicos de la marca Invitrogen para la detección de genes de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.* y *Escherichia coli* O157:H7, utilizando como referencia controles positivos. Los resultados evidenciaron la presencia de *Listeria monocytogenes* en el 54 % (6/11) de las muestras, *Escherichia coli* en el 36 % (4/11) y *Salmonella spp.* en el 18 % (2/11), siendo la técnica de PCR más sensible y precisa en la detección de *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes*, lo que confirma los hallazgos obtenidos con los controles positivos. En conclusión, la detección de estas bacterias patógenas en agua embotellada representa un riesgo significativo para la salud y bienestar de los consumidores, por lo que resulta fundamental aplicar un control microbiológico riguroso en la producción y comercialización de este producto.

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

ABSTRACT

The research project entitled “The Quality of Bottled Water in the Province of Bolívar through Biomolecular Analysis (PCR) and Microbiological Cultures” aimed to analyze the microbiological quality of bottled water produced by different companies in the province using two complementary methodologies: specific culture media for the development of microorganisms and molecular biology techniques (end-point PCR). A completely randomized design (CRD) with a factorial arrangement A x B (5 x 2) and three replications was applied, evaluating a total of 11 bottled water brands through selective and differential culture media expressed in CFU/mL, along with Invitrogen brand specific primers for the detection of genes of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.*, and *Escherichia coli* O157:H7, using positive controls as reference. The results showed the presence of *Listeria monocytogenes* in 54% (6/11) of the samples, *Escherichia coli* in 36% (4/11), and *Salmonella spp.* in 18% (2/11), with the PCR technique proving to be more sensitive and accurate in detecting *E. coli* O157:H7 and *L. monocytogenes*, which confirmed the findings obtained with positive controls. In conclusion, the detection of these pathogenic bacteria in bottled water represents a significant risk to consumer health and well-being, making it essential to apply strict microbiological control in the production and commercialization of this product.

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

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, diversas enfermedades se originan por un inadecuado tratamiento del agua, lo que provoca contaminación cruzada en las redes de distribución y en las plantas de procesamiento, afectando directamente a quienes la consumen. La Organización Mundial de la Salud (OMS) define el agua de consumo humano como aquella que puede ingerirse durante toda la vida sin causar daños significativos al organismo. Sin embargo, un mal manejo de su calidad puede generar enfermedades que impactan de manera directa en la salud de las personas. Para evitarlo, se han establecido normas internacionales destinadas al control adecuado del agua de consumo, garantizando así beneficios para la salud (OMS, 2018).

Debido a estos riesgos, gran parte de la población desconfía de la calidad del agua no tratada y opta por consumir agua embotellada de marcas reconocidas, relegando a las nuevas marcas. Actualmente, la industria del agua embotellada presenta un crecimiento anual cercano al 7% a nivel mundial, lo que incrementa la posibilidad de que algunas empresas no mantengan un control riguroso y no cumplan con los estándares requeridos, ocasionando la presencia de compuestos contaminantes.

En el Ecuador, la situación es similar de acuerdo con Euromonitor Internacional (2018), el consumo de agua purificada embotellada alcanzó los 41 litros por persona, reduciendo significativamente la ingesta de bebidas azucaradas y gaseosas (Zepeda & Tello, 2025). No obstante, persiste la desconfianza, ya que algunos envases presentan sabores extraños y carecen de información obligatoria como fecha de

expedición, fecha de caducidad o número de lote, lo cual genera dudas respecto al cumplimiento de las normas y estándares de calidad.

Cabe destacar que el agua utilizada para ser embotellada puede contener contaminantes tanto químicos como microbiológicos, favoreciendo el desarrollo de patógenos y la presencia de sustancias nocivas que representan un riesgo para la salud del consumidor.

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 los envases 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 (INEC & UNICEF, 2018). Según estudios de entidades como Unicef y Banco Mundial el

17,8% de agua embotellada en Ecuador posee contaminantes tanto químicos como microbiológicos.

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 (Estupiñán & et al, 2025).

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 así verificar la calidad del mismo.

HIPÓTESIS

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*, *Salmonella* y *Escherichia coli* que afectan la calidad microbiológica del agua embotellada purificada.

$$H_0: \mu_1 = \mu_1$$

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*, *Salmonella* y *Escherichia coli* que afectan la calidad microbiológica del agua embotellada purificada.

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

CAPÍTULO I

1 MARCO TEÓRICO

1.1 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. La molécula del agua representada en la figura 1 tiene una estructura denominada dipolar dándole a sí una gran ventaja para disolver cualquier tipo de sustancias conociéndole como disolvente universal (Barcia, 2024).

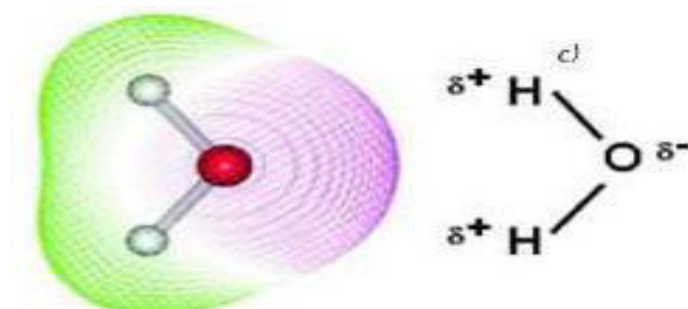


Figura 1. Estructura del agua.

Fuente: (Peralta, 2022).

1.1.1 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 (Uddin & et al, 2021).

1.1.2 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 en la Tabla 1 se detallan los requisitos físicos para el agua purificada según la NTE INEN 2200 (Villa, 2022).

Tabla 1. Requisitos físicos para el agua purificada.

Requisito		Unidad	Min	Máx.	Método de ensayo
Color		Pt-Co ^b	-	5	NTE INEN-ISO 7887
Turbidez		NTU ^a	-	1	NTE INEN-ISO 7027
Solidos Totales Disueltos		mg/L	-	500	2540 solidos Standard Métodos
Aguas purificadas					
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.				

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

Tabla 2. Requisitos microbiológicos.

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

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

En lo cual:

El caso 10^a 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 las 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 (ARCSA, 2021).



Figura 2. Calidad del agua.

Fuente: Lablouispasteur (2018).

1.1.3 Estándares de calidad para el agua envasada

La Organización Mundial de la Salud (OMS) es el ente encargado de establecer las normas para la calidad del agua purificada y envasada 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 permitidos 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).

1.1.4 Tipos de agua embotellada

Actualmente existen empresas que producen una infinidad de agua embotellada generando así una pequeña confusión al momento de elegir el envase con el producto por lo que el agua dependiendo la marca es diferente. Cada agua procesada y envasada 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 si la opción de elegir de acuerdo a la necesidad del consumidor (Martín, 2023).



Figura 3. Tipos de agua embotellada.

Fuente: Bigstock (2020).

Los diferentes tipos de agua envasada no deben poseer colorantes saborizantes extractos o esencias ni azúcares que alteren al mismo. El agua purificada, carbonatada, manantial, ionizada y envasada 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 2200, 2017).

1.1.5 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 cubren el agua que se encuentra bajo extrema presión.

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 que fluye 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, lo cual es corroborado mediante análisis microbiológicos lo que la hace adecuada para el consumo y descarta riesgos para el consumidor final.

Agua gasificada

El agua gasificada se obtiene mediante un proceso de carbonatación industrial en las plantas de producción, en el cual se añade dióxido de carbono a una presión y temperatura adecuada, lo que genera la reacción de efervescencia característica de este tipo de bebidas (OMS, 2023). Su principal ventaja al momento de consumir es que ayuda a la secreción de los jugos gástricos, lo que mejora la digestión cuando se consume alimentos pesados.



Figura 4. Agua gasificada.

Fuente: 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, lo que brinda un ligero sabor y se lo dulcifica con edulcorantes en mínimas cantidades y en algunos es posible que contengan suplementos adicionales. El consumo de estas bebidas dependiendo el enfoque, 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.

La 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 (RTE INEN 055, 2011).

Agua de llave

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

Ozonización

Según Valdivieso (2022), 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 microfloculación 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 tóxicas que el agua puede contener (Llanos & Condo, 2022).

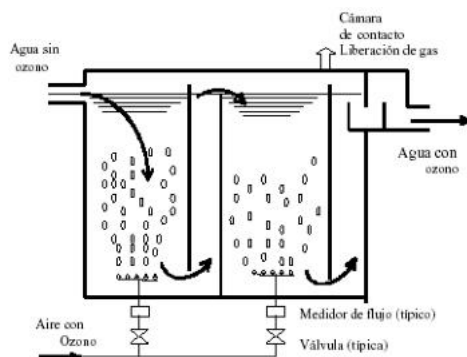


Figura 5. Cámara de ozono para el agua.

Fuente: Fernández (2017).

Ósmosis inversa

La ósmosis 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 (Aytaç & et al, 2024).

Agua mediante proceso de destilación

Mediante el proceso de destilación se eliminan sales minerales, algunos patógenos, electrolitos y posibles sustancias tóxicas o dañinas. Por lo cual, la calidad de este líquido es utilizado en hospitales, laboratorios, e industrias; cabe recordar que este líquido no es muy recomendable para el consumo debido al proceso por el que pasa ya que se eliminan electrolitos y sales minerales que son los responsables de mantener la hidratación (Ortega & Gutiérrez, 2020).

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 embotellada directamente de la fuente. Las empresas que están 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 estipulados por las normas INEN evitando exceder límites de diferentes sustancias tóxicas (Irala & Ramos, 2022).

1.1.6 Regulaciones para el agua embotellada

Las medidas establecidas para el agua envasada 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.

1.1.7 Requisitos sanitarios de las 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 (Concha & et al, 2024).

1.2 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:

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.

1. 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

2. 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
3. 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
4. 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
5. En el cantón San Miguel se encuentra la empresa BEBACUA la cual es dedicada a la producción agua embotellada en garrafas.
6. En el cantón Chimbo se encuentra la empresa AQUA PURITECH la cual es dedicada a la producción de agua embotellada
7. En el cantón Guaranda, en la parroquia Julio Moreno se encuentra la empresa AGUA CASHAPAMBEÑA la cual es dedicada a la elaboración agua embotellada.
8. En el cantón Guaranda, en la parroquia Santa Fé se encuentra la empresa AQUA SANTA la cual es dedicada a la elaboración agua embotellada.
9. 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.
10. En el cantón Guaranda, en la parroquia Guanujo se encuentra la empresa AGUA BOLÍVAR la cual es dedicada a la elaboración agua embotellada.

11. 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.
12. En el cantón Caluma, en la parroquia Caluma se encuentra la empresa AGUA PURIFICADA ENVASADA CALUMA la cual es dedicada a la elaboración de hielo y agua embotellada.
13. 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.
14. En el cantón Caluma, recinto san Vicente se encuentra la empresa AGUA CALUMENÑA la cual es dedicada a la elaboración de hielo y agua embotellada.
15. 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.
16. 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.

1.3 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 ADN y ARN y las proteínas 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 (Yepes & et al, 2022).

1.3.1 Análisis Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) 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 (Saleem & et al, 2022).

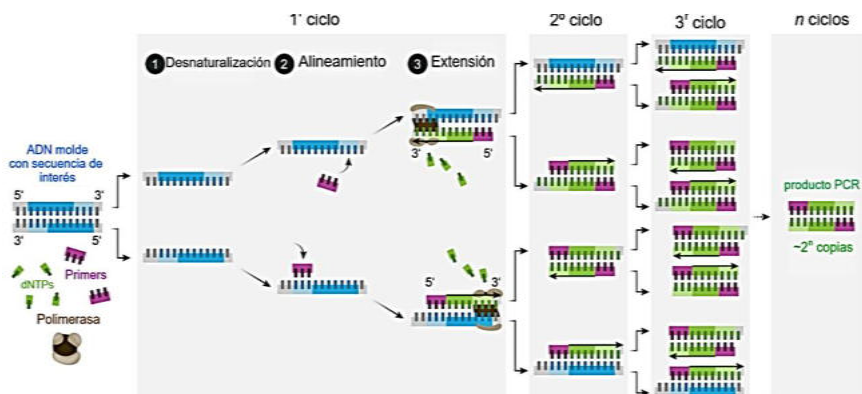


Figura 6. Esquema del Mecanismo PCR.

Fuente: Ramirez (2022).

Nota: La figura detalla el proceso de amplificación hasta tener suficientes muestras de ADN.

1.3.2 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 (Bogiel & et al, 2024).

1.3.3 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.

1.3.4 *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 (Cedeño & et al , 2020).

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 (Chila & et al, 2024).

1.3.5 *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 más comunes *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, entre otros, siendo las responsables del 90% de infecciones (Some & et al, 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 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 (Caycedo & et al, 2020).



Figura 7. Bacterias presentes en el agua.

Fuente: Tomado de Castrejos (2021).

1.3.6 *Escherichia Coli*

Taxonomía

Tabla 3. Clasificación Taxonómica de Escherichia coli.

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

Fuente: Castellano (2022).

Se encuentra de manera natural en el tracto intestinal de diferentes mamíferos incluyendo el ser humano, 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 debido a la contaminación por la presencia de residuos fecales de animales y/o

humanos en los medios acuáticos por diversos medios como materia fecal en patas de animales, daños en fosas sépticas, mal manejo de residuos en zonas rurales, entre otros medios que propician la contaminación de fuentes, ríos y aguas subterráneas (Gomes & et al, 2024).

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 (Tarazona, 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 4.

Tabla 4. Requisitos microbiológicos para el agua purificada envasada y el agua purificada mineralizada envasada.

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

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

^b 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).

1.3.7 Listeria

Tabla 5. Taxonomía de Listeria monocytogenes.

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

Fuente: 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 (Osek & et al, 2022).

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 (Agboola & Bisi, 2023).

Tabla 6. Taxonomía salmonella.

Taxonomía	
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: 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 género gramnegativo perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* siendo resistente y sobreviviendo durante mucho tiempo en agua y semanas en ambientes secos (Maruf & Rahman, 2024).

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 (Centros para el control y la prevención de enfermedades, 2022).



Figura 1. Contaminación por Salmonella.

Fuente: Juárez (2020).

1.4 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.

1.4.1 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 (Equipos y Laboratorio de Colombia S.A.S , 2022).

1.4.2 Cultivo mixto

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

1.5 Técnicas de cultivo en placa

El cultivo en placas es una técnica utilizada para la siembra de una muestra sobre un medio sólido, usualmente agar nutritivo, selectivo o diferencial, dependiendo del objetivo del estudio.

1.5.1 Técnica por estría en superficie

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

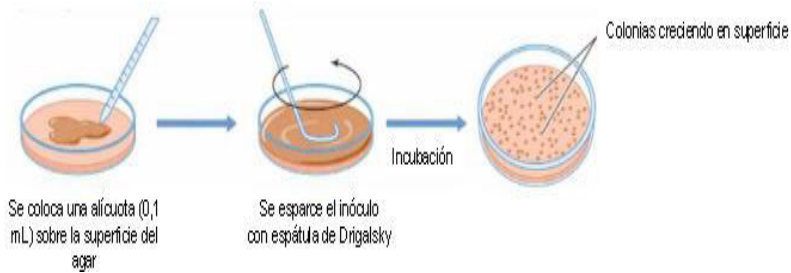


Figura 2. Cultivo por estría en superficie.

Fuente: Miranda (2017).

1.5.2 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.

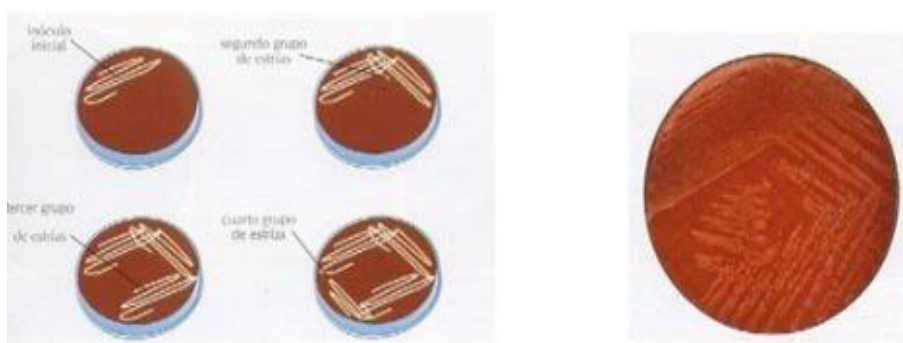


Figura 3. Aislamiento por estría múltiple.

Fuente: Taleno (2020).

1.5.3 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 (Santos, 2022).

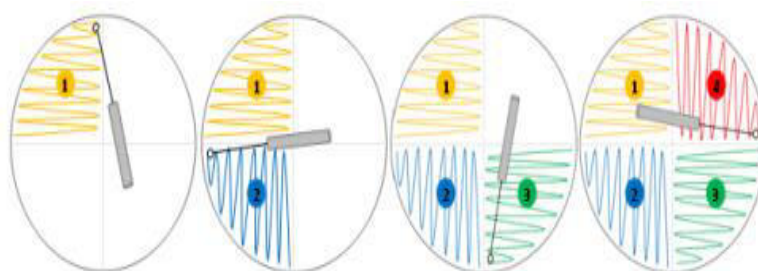


Figura 4. Cultivo mediante cuatro cuadrantes.

Fuente: Neuquen (2021).

1.5.4 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 (Dahal, 2025).

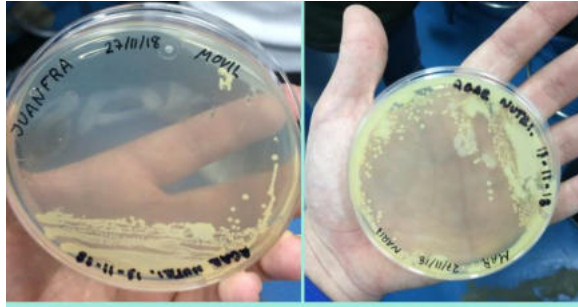


Figura 5. Siembra por agotamiento en superficie.

Fuente: JFLAbclinico (2022).

1.5.5 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).

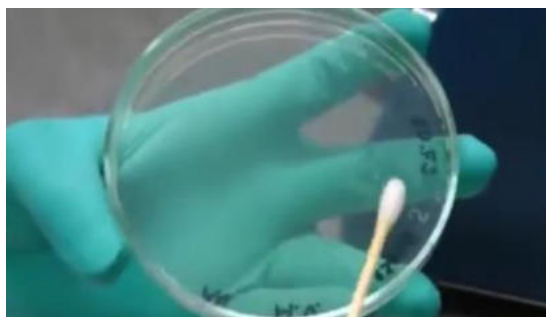


Figura 6 Siembra masiva en placa.

Fuente: Miranda (2020).

1.5.6 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 micrológica 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 7. Siembra por punción en placa.

Fuente: Baixar (2016).

1.5.7 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 asadigrasky se distribuye en la placa para su cultivo y se incuba dependiendo la temperatura y el tiempo para el microorganismo a estudiar (German, 2022).

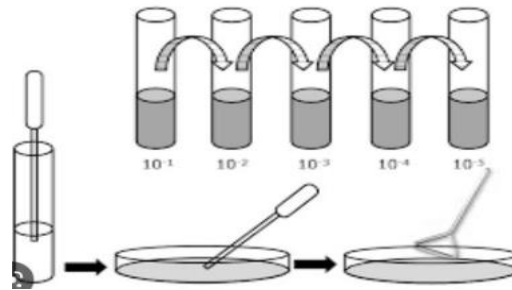


Figura 8. Siembra por dilución.

Fuente: Barros (2022).

1.6 Técnicas de siembra para tubos

El cultivo en tubos es una técnica utilizada en el cultivo y aislamiento de microorganismos de interés.

1.6.1 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).

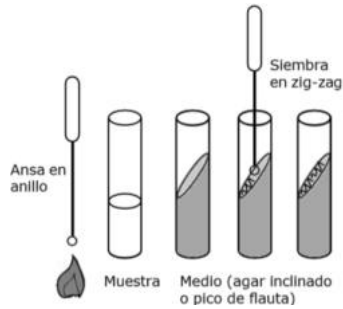


Figura 9. Siembra en tubos por estría simple.

Fuente: Barros (2022).

1.6.2 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.

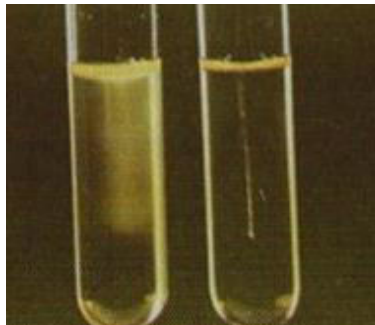


Figura 10. Siembra por picadura en tubo.

Fuente: Taleno (2020).

1.6.3 Siembra mixta en tubos

Esta técnica se realiza en tubos con medios solidos 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).

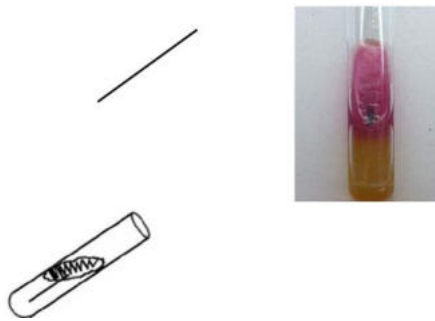


Figura 11. Siembra por picadura y estría.

Fuente: Barrera (2019).

1.6.4 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 liquido 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).

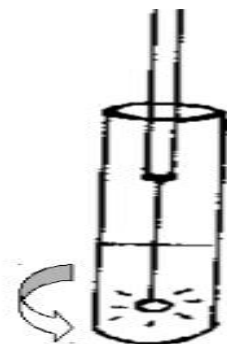


Figura 12. Siembra por agitación.

Fuente: Barrera (2019).

1.7 Tipos de medio de cultivo según su función

Los medios de cultivo se caracterizan por tener nutrientes específicos que permiten el crecimiento de bacterias específicas, lo que facilita su estudio.

1.7.1 Medio general

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

1.7.2 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 (Yousef & et al, 2022).

1.7.3 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 (Bonnet & et al, 2020).

1.7.4 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, 2025).

1.7.5 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 (Jiménez & et al, 2024).

1.8 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:

1.8.1 *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 (Flores & et al, 2024).

1.8.2 *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 α -hemolisis (hemolisis parcial) apareciendo un halo de colores verdosos alrededor de la colonia (Soria & Vilca, 2025).

1.8.3 *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 (Insumolab, 2018).

1.8.4 *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).

1.8.5 *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).

1.8.6 *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).

1.8.7 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 fórmula del agar no se encuentra tan concentrada permitiendo así la difusión de los antimicrobianos (Britania Lab, 2021).

1.8.8 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 espectar los microorganismos productores de ácido sulfhídrico como son colonias con centros de color negro (Valdes, 2021).

1.8.9 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 color característico 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 las azúcares se fermentan (Rossi, 2021).

1.8.10 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 microorganismos aerobios y anaerobios, se lo puede utilizar en 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).

1.8.11 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, 2025).

CAPÍTULO II

2 MARCO METODOLÓGICO

2.1 Localización de la investigación

Este proyecto investigativo se desarrolló 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.

Parámetro	Valor
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 mms
Heliofanía(H/L) /año	100
Humedad relativa	70%
Velocidad promedio del viento	6 m/s

Fuente: Puga (2021).

2.1.1 Situación geográfica y climática

Tabla 8. Datos de la situación climática y geográfica.

Parámetro	Valor
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).

2.1.2 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.

2.2 Materiales

2.2.1 Material experimental

Las muestras 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.

2.2.2 Materiales de oficina

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

2.2.3 *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

2.2.4 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 en Cadena de la Polimerasa (PCR)

- GoTaq Green Master Mix, 2x.
- Agua libre de nucleasas
- Cebadores o primers forwar y reverse.
- Kit de extracción ADN.

2.3 Métodos

2.3.1 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	A	a ₁ : Chimbo
		a ₂ : Guaranda
		a ₃ : San Miguel
		a ₄ : Caluma
		a ₅ : Chillanes
Método de análisis	B	b ₁ : Análisis Biomolecular PCR
		b ₂ : Cultivos

Nota: Trabajo experimental.

2.3.2 *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.

2.3.3 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.

2.3.4 Tipo diseño experimental o estadístico

Se aplicó 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_{ijk}: Variable sujeta a medición

μ: Representa la media global

A_i: Es el efecto del factor A

B_j: Efecto del factor B

(AB)ij: Efecto de la interacción A x B

Eijk: Efecto Del Error Experimental Aleatorio.

Tabla 12. Modelo de Análisis de varianza ANOVA.

F.de Viabilidad	S. Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F_{exp}	Valor de P
Factor A	SC _A	a-1	CM _A	CM _A /CM _E	P(F>F ₀ ^A)
Factor B	SC _B	b-1	CM _B	CM _B /CM _E	P(F>F ₀ ^B)
Factor AB	SC _{AB}	(a-1) (b-1)	CM _{AB}	CM _{AB} /CM _E	P(F>F ₀ ^{AB})
Error	SC _E	ab(n-1)	CM _E		
Total	SC _T	abn1			

Nota: Tomado de Gutiérrez (2008).

2.4 Métodos de evaluación y datos a tomarse

2.4.1 Variable de respuesta

- Concentración de bacterias**

Se 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.

2.5 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 geografía 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 logró:

- 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.

2.5.1 Recolección de datos

Mediante la recolección de datos se aseguró 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.

2.6 Manejo del experimento

2.6.1 *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.

2.6.2 *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.

2.6.3 *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.

Código	Origen, Cantón	Cantón	Lugar de procedencia	Hora
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: Anacarcis 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		1000 mL	Quilayaco Calle: Continuación Regulo De Mora	10:10 am
	Chillanes			
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.

2.7 Análisis Microbiológicos

2.7.1 Aislamiento de *E. Coli*

Se preparó 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, en su preparación se pesó 12 gramos de agar y se agregó 255 mL de agua destilada, se homogenizo la mezcla y se dejó reposar durante 10 minutos, luego se

depositó en un vaso precipitado con imanes giratorios para poner en una plancha de agitación con calentamiento para que se disolviera por completo el agar hasta el punto de ebullición, y se lo dejó reposar hasta una temperatura de 40°C, seguidamente se incorporó en las placas petri y se dejó enfriar.

Se trabajó mediante el método filtración por membrana bajo la Norma Técnica Ecuatoriana INEN-ISO 9308-1, de las 11 muestras de agua embotellada se extrajo 100 mL 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.

Se retiraron cuidadosamente las membranas con el uso de pinzas y se depositó en cajas petri previamente rotuladas con el medio de cultivo para cada una de las muestras, y se procedió a incubar 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, 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 incubará durante 24 horas más y luego se determinará y analizará mediante la tinción de Gram.

2.7.2 Aislamiento de *Listeria*

Para la detección de *Listeria spp.* en muestras de agua embotellada se empleó el medio ALOA *Listeria* Agar Base (Figuroa & et al, 2023). Este medio contiene peptona de carne como fuente principal de

nutrientes, así como extracto de levadura, que aporta vitaminas del grupo B. El piruvato sódico actúa como fuente adicional de energía, favoreciendo el desarrollo del patógeno. La selectividad del medio está dada por la presencia de ácido nalidíxico, polimixina, cloruro de litio, cicloheximida y ceftazidima. Además, el sustrato cromogénico permite detectar la enzima β -glucosidasa característica de *Listeria*, que genera colonias de color azul; mientras que el sustrato lipasa forma una aureola opaca de color blanco alrededor de dichas colonias.

Para su preparación, se pesaron 18 g de ALOA *Listeria* Agar Base (L. mono diferencial Agar Base) y se disolvieron en 255 mL de agua destilada. La mezcla se homogenizó y posteriormente se calentó en plancha con agitación hasta alcanzar el punto de ebullición. Luego, se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos y se enfrió hasta alcanzar una temperatura de 45–50 °C. Finalmente, se vertió en cajas Petri estériles y se dejó solidificar.

El análisis se realizó mediante el método de filtración por membrana, conforme a la Norma (ISO-9308-1, 2019). De cada una de las 11 muestras de agua embotellada se extrajeron 100 mL, que fueron filtrados a través de membranas estériles (CHM, MPV045047H, España) colocadas en un embudo Büchner acoplado a la rampa de succión. Posteriormente, las membranas se retiraron cuidadosamente con pinzas estériles y se colocaron en las cajas Petri previamente rotuladas con el medio de cultivo correspondiente, procediendo a incubar bajo las condiciones establecidas.

Tras la incubación en condiciones de aerobiosis, las colonias características de *Listeria* spp. fueron sub-cultivadas en agar cromogénico, siguiendo el método descrito en la norma ISO 11290-1. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas; en caso de resultados negativos, la incubación se prolongó por un periodo adicional de hasta 24 horas. Finalmente, las colonias fueron analizadas mediante tinción de Gram para su confirmación.

2.7.3 Aislamiento de *Salmonella*

Para la determinación de *Salmonella* spp. se preparó el medio agar XLD (Xilosa Lisina Desoxicolato), utilizado para evaluar la posible presencia de esta bacteria en muestras de agua embotellada. El agar XLD contiene extracto de levadura como principal fuente de nutrientes, aportando la energía necesaria para el desarrollo bacteriano. Asimismo, incorpora desoxicolato de sodio, compuesto que inhibe el crecimiento de bacterias Gram positivas, y lisina, la cual permite la diferenciación de *Salmonella* spp.

Para su preparación, se pesaron 14 g de medio XLD deshidratado, los cuales fueron disueltos en 255 mL de agua destilada. La mezcla se homogenizó hasta su completa disolución y se dejó reposar durante 10 minutos. Posteriormente, se transfirió a un matraz con un imán de agitación y se colocó sobre una plancha de agitación, se elevó la temperatura hasta alcanzar el punto de ebullición. Luego, se dejó reposar hasta descender a 40 °C en baño maría, para finalmente verter el medio en cajas Petri estériles, donde se dejó enfriar y solidificar.

Se procesaron 11 muestras de agua embotellada mediante el método de filtración por membrana, siguiendo la Norma Técnica Ecuatoriana ISO 19250:2013. Para ello, se extrajeron 100 mL de cada muestra, los cuales se filtraron a través de membranas estériles (CHM, MPV045047H, España) colocadas en un embudo Büchner acoplado a una rampa de succión. Conforme al procedimiento descrito por (Nuñez & Bayas, 2019), las membranas fueron retiradas cuidadosamente con pinzas estériles y depositadas en las cajas Petri previamente rotuladas con el medio de cultivo. Finalmente, las placas se incubaron bajo las condiciones específicas de temperatura y tiempo correspondientes al ensayo.

Luego de la incubación bajo condiciones de aerobiosis, se observaron colonias características de *Salmonella*, de color negro con un halo transparente rojizo, según el serotipo. Estas colonias fueron nuevamente cultivadas en medio XLD, siguiendo el método establecido en la Norma (Quinto & et al, 2019) (enmienda). Las placas se incubaron a 41,5 °C durante 24 horas; en caso de no evidenciarse crecimiento, la incubación se extendió por 24 horas adicionales. Finalmente, las colonias obtenidas fueron analizadas mediante la técnica de tinción de Gram.

2.7.4 Tinción de Gram

Mediante la técnica microscópica fue posible observar la coloración y presencia de los microorganismos, diferenciando entre Gram positivos, como *Listeria spp.*, que se tiñeron de azul, y Gram negativos, como *Escherichia coli* y *Salmonella spp.*, que adquirieron una coloración rosada. Tras el análisis de la morfología celular y la confirmación

microscópica, los aislados fueron conservados en crioviales con glicerol al 10% y caldo nutritivo, para posteriormente ser almacenados a -20°C y utilizados en los análisis moleculares correspondientes (López-Jácome, 2014).

2.8 Análisis Molecular (PCR) Reacción en cadena de la polimerasa

Para el análisis molecular se aplicó la metodología de PCR convencional. 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 que permitió la identificación y detección de distintos genes, ejecutándose en un volumen de total de $50\ \mu\text{L}$ conteniendo en el mismo $45\ \mu\text{L}$ de la mezcla de los reactivos y $5\ \mu\text{L}$ del ADN extraído en lo cual se utilizaron 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_2 y los tintes de color amarillo y azul mismos que permiten monitorear el progreso durante el proceso de electroforesis. Seguidamente se colocó $45\ \mu\text{L}$ de la solución GoTaq® Green Master Mix ya preparada en un

micro tubo eppendorf y se adicionó 5 µL de AND que fueron extraídos de los aislados confirmados, se llevó la solución lista al termociclador (Biometra TAdvanced) y se corrieron los ciclos establecidos en la tabla 14 para la amplificación en PCR de *Listeria*, *Salmonella*, *E. coli*.

Los resultados se analizaron mediante electroforesis horizontal con gel de agarosa (Agarose®) (Fisher bioagents, BP160-100, USA) al 2%, preparado con el tampón al 1X, se adicionó 4 µL del colorante Nucleic Acid Dye (Diamond™) y se sometió a 135 voltios durante 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 genómico fue amplificado mediante PCR convencional (Reacción en Cadena de la Polimerasa), utilizando cebadores específicos diseñados para amplificar regiones conservadas de genes diana asociados a la identificación y detección de bacterias patógenas de interés sanitario. Para la detección de *Listeria spp.*, se emplearon primers dirigidos al gen 16S ARNr, ampliamente utilizado en la identificación filogenética bacteriana, así como al gen hlyA, relacionado con la virulencia del género. En el caso de *Salmonella spp.*, los cebadores fueron diseñados a partir de regiones conservadas del gen invA, reconocido como un marcador molecular altamente específico para este patógeno. Para la identificación de *Escherichia coli*, se utilizaron iniciadores específicos dirigidos al gen uidA, que codifica la β-glucuronidasa y es ampliamente empleado como marcador molecular de esta especie. Los iniciadores utilizados fueron descritos por por

(Meghdadi & et al, 2019), (Nuñez & Bayas, 2019) y (Gomez & Torres, 2022), cuyas secuencias se detallan en la tabla 14.

Tabla 14. Cebadores específicos utilizados en esta investigación.

Bacteria	Secuencia	Pares de bases bp	Referencias
<i>Listeria monocytogenes</i>	(R,5'- GCCGTCGATGATTGAACTTCATC- 3') (F,5'- GAATGTAAACTTCGGCGCAATCAG- 3')	388 bp	(Meghdadi & et al, 2019)
<i>Escherichia coli</i> serotipo O157:H7	(R,5'- GCTATTTCTGCCGATAAGAGA-3') (F,5'- CCAGGCAAAGAGTTTATGTTGA-3')	212 bp	(Nuñez & Bayas, 2019)
<i>Salmonella spp.</i>	<i>invA3R</i> (R,5'- TCCATCAAATTAGCGGAGGC-3') <i>invA3F</i> (F,5'- AACGTGTTTCCGTCGTAAT-3')	244 bp	(Gomez & Torres, 2022)

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 utilizados

en la prueba PCR para cada uno de los microorganismos de estudio se describen en la tabla 15.

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			
River , 10µM	0.25 -2.5µL	18	12	6
DNA Templade	1-5 µL			
Nuclease-Free Wáter	25 µL			
Volumen total		729	486	243
		/18=40,5 µL	/12=40,5 µL	/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
1	72/ 7 min	72/5 min	72/5 min	Extensión

Fuente: Meghdadi & Nassirabady(2019), Nuñez & Bayas (2020).

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.

2.9 Tabulación

Según los resultados obtenidos de la recolección de datos se realizaron 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.

CAPÍTULO III

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 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.

Código	Origen, Cantón	Estado de funcionamiento	Lugar de procedencia	Coordenadas
T1	San Miguel	Trabaja	Av. Veintimilla y 10 de enero	-1.707537, -79.041008
T2	Guaranda	Trabaja	Santa Fe	-1.6212209, -79.0130030
T3	Guaranda	Cerrado temporalmente	Guanujo; Esquinas	4 -1.526933, -78.991118
T4	Guaranda	Cerrado temporalmente	Julio Moreno Recinto Cashapamba	-1.573704, -79.0273223
T5	Guaranda	No existe	Simiatug	No existe
T6	Guaranda	Se traslado fuera de la Prov.	Alpachaca Sector UEB	-1.568673, -79.008234

T7	Chimbo	Trabaja	Tamban ciud. Santa Marianita	-1.676940,- 79.034867
T8	Caluma	Cerrado temporalmente por mantenimiento	Vía Montalvo- Recinto Tablas De La Florida	-1.665913,- 79.257549
T9	Caluma	Trabaja	Caluma vía Guaranda a 100 metros de hostería Madera fina	-1.613984,- 79.245890
T10	Caluma	Trabaja	Rec. La Alsacia vía el santuario de la virgen.	-1.670279,- 79.248331
T11	Caluma	Trabaja	Calle: Anacarcis Camacho 1091 Av. La naranja	-1.631103,- 79.258560
T12	Caluma	Trabaja	Vía a Charquiyacu Recinto san Vicente	-1.587021,- 79.225773
T13	Caluma	Cerrado temporalmente	La Fortuna S/N Vía A La Esmeralda, Cerca El Complejo	-1.639717,- 79.254712

			Deportivo La Roca	
T14	Chillanes, San José del Tambo	Cerrado se trasladó fuera	San José del Tambo (Tambopamba), vía San Vicente	-1.954493,- 79.222586
T15	Chillanes, San José del Tambo	Cerrado temporalmente	Recinto la Colombia, junto al subcentro de salud	-2.013524,- 79.225983
T16	Chillanes, San José del Tambo	Trabaja	Recinto Nuevo Porvenir	-2.171292, - 79.094989
T17			Quilayaco Calle: Continuación Regulo de Mora	-1.941937,- 79.062981
	Chillanes	Trabaja		
T18	Chillanes San José del Tambo	Trabaja	Frente a la escuela Colombia Alta	-2.012749,- 79.228704
19	Caluma	Trabaja	Vía al valle	-1.670390,- 79.223931

Nota: Trabajo experimental.

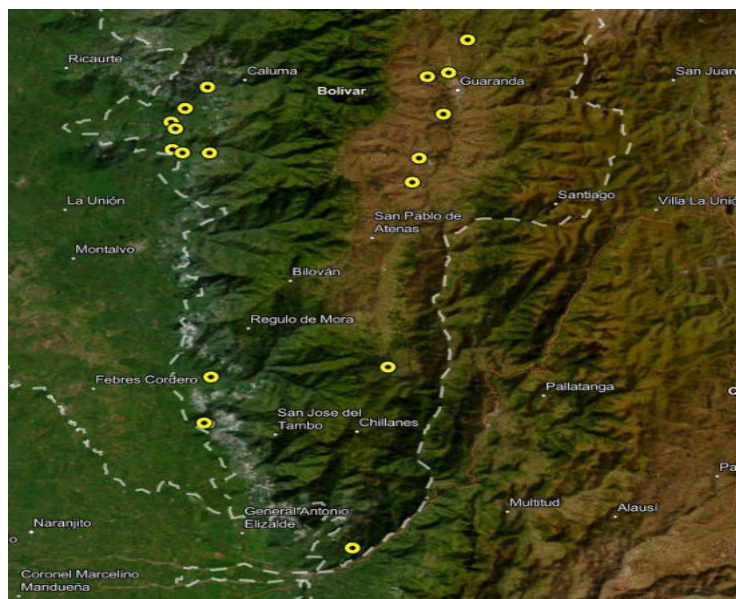


Figura 8. Georreferenciación de las empresas embotelladoras de agua en la Provincia Bolívar.

En la Figura 8 se presenta los resultados de la georreferenciación, para la que se usó 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.

3.2 Resultados microbiológicos

3.2.1 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	Mo.	1era repetición	2da repetición	3era repetición	Unidad	Método de análisis de referencia
		12 abril 2023	10 de mayo 2023	1 junio 2023		
T1- T1,1- T1,2		135	60	35		
T2- T2,1- 2,2		14	6	6		
T3- T3,1- T3,2		na	na	na		
T4- T4,1- T4,2	<i>Listeria</i>	na	na	na	UFC/ 100mL	ISO 9001:2015

T7-	0	0	0
T7,1-			
T7,2			
T8-	na	na	na
T8,1-			
T8,2			
T9-	0	0	0
T9,1-			
T9,2			
T10-	0	0	0
T10,1-			
T10,2			
T11-	0	0	0
T11,1-			
T11,2			
T12-	12	9	10
T12,1-			
T12,2			
T13-	na	na	na
T13,1-			
T13,2			
T15-	na	na	na
T15,1-			
T15,2			

T16-	35	24	18
T16,1-			
T16,2			
T17-	76	26	22
T17,1-			
T17,2			
T18-	0	0	0
T18,1-			
T18,2			
T19-	13	7	9
T19,1-			
T19,2			

Max: 0

En la Tabla 17 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 transcurso de envasado, 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.

3.2.2 *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.

Muestra	Código	Gram
T1	T1	Bacilos (+)
	T1,1	Bacilos (+)
	T1,2	Bacilos (+)
T2	T2	Bacilos (+)
	T2,1	Bacilos (+)
	T2,2	Bacilos (+)
T12	T12	Bacilos (+)
	T12,1	Bacilos (+)
	T12,2	Bacilos (+)

	T16	Bacilos (+)
T16	T16,1	Bacilos (+)
	T16,2	Bacilos (+)
	T17	Bacilos (+)
T17	T17,1	Bacilos (+)
	T17,2	Bacilos (+)
	T19	Bacilos (+)
T19	T19,1	Bacilos (+)
	T19,2	Bacilos (+)

Nota: Trabajo experimental.

Tabla 20. Anova para Listeria.

Fuente	Suma Cuadrados	de Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
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.

Tratamientos	Casos	Media	Grupos Homogéneos
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 la Figura de medias:

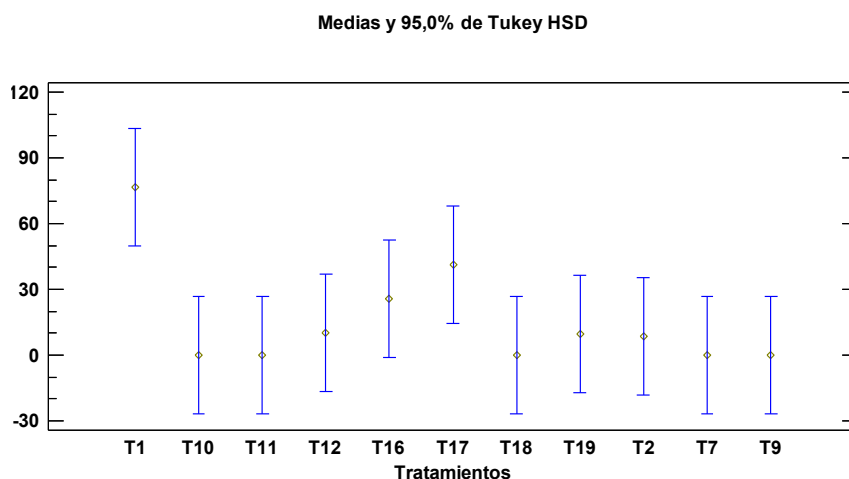


Figura 9. Medias de los porcentajes de Listeria.

Nota: Trabajo experimental.

En la Figura 9 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.

3.2.3 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- T2,2		0	0	0		
T3- T3,1- T3,2		na	na	na		
T4- T4,1- T4,2		na	na	na		

T7-	0	0	0		
T7,1-					
T7,2				UFC/ 100m L	NTE INEN- ISO 9308-1
T8-	na	na	na		
T8,1-	<i>E. coli</i>				
T8,2					
T9-	0	0	0		
T9,1-					
T9,2					
T10-	17	12	9		
T10,1-					
T10,2					
T11-	0	0	0		
T11,1-					
T11,2					
T12-	0	0	0		
T12,1-					
T12,2					
T13-	na	na	na		
T13,1-					
T13,2					
T15-	na	na	na		
T15,1-					
T15,2					

T16-	0	0	0
T16,1-			
T16,2			
T17-	37	14	10
T17,1-			
T17,2			
T18-	0	0	0
T18,1-			
T18,2			
T19-	16	12	10
T19,1-			
T19,2			

Max: 0

Nota: Trabajo experimental.

En la Tabla 21 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 envasado, 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.

3.2.4 *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.

Muestra	Código	Gram
T1	T1	Bacilos (-)
	T1,1	Bacilos (-)
	T1,2	Bacilos (-)
T10	T10	Bacilos (-)
	T10,1	Bacilos (-)
	T10,2	Bacilos (-)
T17	T17	Bacilos (-)
	T17,1	Bacilos (-)
	T17,2	Bacilos (-)

	T19	Bacilos (-)
T19	T19,1	Bacilos (-)
	T19,2	Bacilos (-)

Nota: Trabajo experimental.

Tabla 24. Anova *Escherichia coli*.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
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.

Tratamientos	Casos	Media	Grupos Homogéneos
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 la Figura de medias:

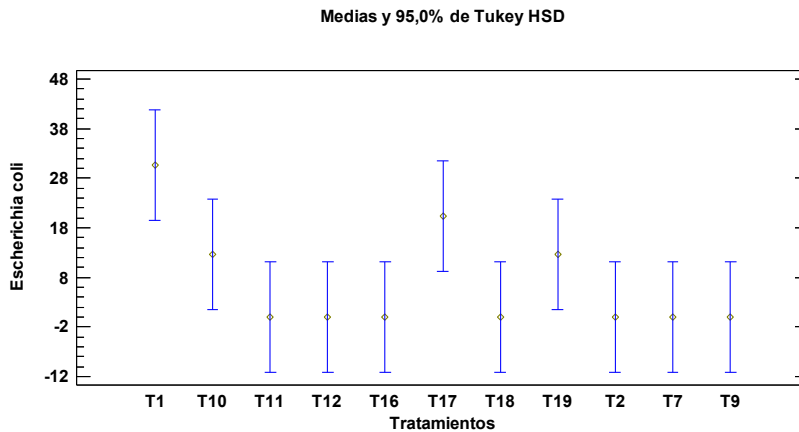


Figura 10. Medias de los porcentajes de *Escherichia coli*.

Nota: Trabajo experimental.

En la Figura 10 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.

3.2.5 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		0	0	0		
T2- T2,1- 2,2		0	0	0		
T3- T3,1- T3,2		na	na	na		
T4- T4,1- T4,2	<i>Salmonella</i> <i>a</i>	na	na	na	UFC/ 100m L	ISO 19250:201 3
T7- T7,1- T7,2		0	0	0		

T8-	na	na	na
T8,1-			
T8,2			
T9-	0	0	0
T9,1-			
T9,2			
T10-	0	0	0
T10,1-			
T10,2			
T11-	0	0	0
T11,1-			
T11,2			
T12-	13	8	9
T12,1-			
T12,2			
T13-	na	na	na
T13,1-			
T13,2			
T15-	na	na	na
T15,1-			
T15,2			
T16-	0	0	0
T16,1-			
T16,2			

T17-	0	0	0
T17,1-			
T17,2			
T18-	0	0	0
T18,1-			
T18,2			
T19-	57	24	16
T19,1-			
T19,2			

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 envasado, un correcto uso de lámpara 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.

3.2.6 *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	T12	Bacilos (-)
	T12.1	Bacilos (-)
	T12.2	Bacilos (-)
T19	T19	Bacilos (-)
	T19.1	Bacilos (-)
	T19.1	Bacilos (-)

Nota: trabajo experimental.

Tabla 28. Anova para Salmonella spp.

Fuente	Suma de 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.

Tratamientos	Casos	Media	Grupos Homogéneos
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 la Figura de medias:

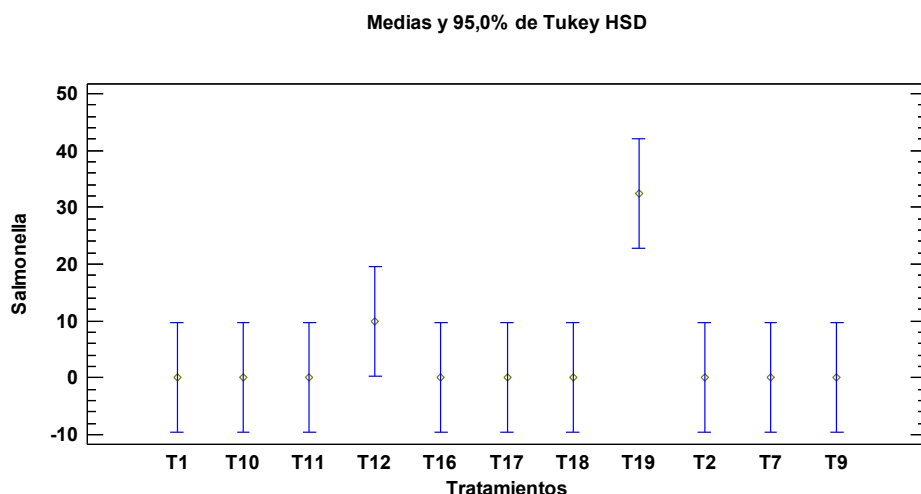


Figura 11. Medias de los porcentajes de *Salmonella* spp.

Nota: Trabajo experimental

En la Figura 11 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.

3.2.7 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.

3.2.8 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 µL.

Concentración de ADN de *Listeria*

Tabla 30. Concentración de ADN mediante Espectrofotómetro Nanodrop para *Listeria monocytogenes*.

Aislados de listeria	Nanodrop
Código	ng/µL
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 (Lino & Reyes, 2024).

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/μL y menor T2 con 48,9 ng/μL, para *Escherichia coli* el más alto fue T17 con 102,5 ng/μL y menor T1 con 56,8 ng/μL y para *Salmonella* el tratamiento T12 con un valor de 94,6 ng/μL y menor con T12 con 54,7 ng/μL todos estos resultados obtenidos estuvieron dentro de los valores de referencia considerándose ADN de calidad óptima.

3.3 Análisis molecular

3.3.1 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 & et al, 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'-GAATGTAACTTCGGCGCAATCAG-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 12. 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.

3.3.2 *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, Prevalencia de Salmonella Spp. y Escherichia Coli en agua de consumo humano en Ecuador, 2019).

Para la amplificación se utilizó los cebadores con su serotipo O157:H7 de marca Invitrogen cuya secuencia fueron: *E. Coli* (R,5'-GCTATTTCTGCCGATAAGAGA-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 extraídos 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 30 segundos, el anillamiento a 56°C por un tiempo de 30 segundos, la extensión a 72°C por 30 segundos y un ciclo final a 72°C por cinco 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 *Escherichia coli* perteneciente al serotipo OH:157 en el cual se utilizó controles positivos de *Escherichia coli*.



Figura 13. Resultados de electroforesis después de realizar PCR con los aislados de *Escherichia coli* donde pb es el marcador de peso molecular E+ es el blanco positivo y T son las muestras de ADN.

3.3.3 Detección de *Salmonella* spp. mediante reacción de cadena de polimerasa (PCR)

Del ADN extraído de los aislados de *Salmonella* spp. fue analizado y amplificado mediante el método descrito por (Nuñez & Bayas, Prevalencia de Salmonella Spp. y Escherichia Coli en agua de consumo humano en Ecuador, 2019).

Para la amplificación se utilizó los cebadores de marca Invitrogen cuya secuencia fueron: *invaA3R* (R,5'-TCCATCAAATTAGCGGAGGC-3') y *inva3F* (F,5'-AACGTGTTTCCGTCGTAAT-3') que reconocen el género de *Salmonella* spp. amplificado en fragmentos aproximadamente de 244 bp como lo menciona (Gomez & Torres, 2022).

De las 11 muestras recogidas por triplicado, tres para cada una de las marcas en las tres repeticiones pertenecieron a T12 y 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 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*.

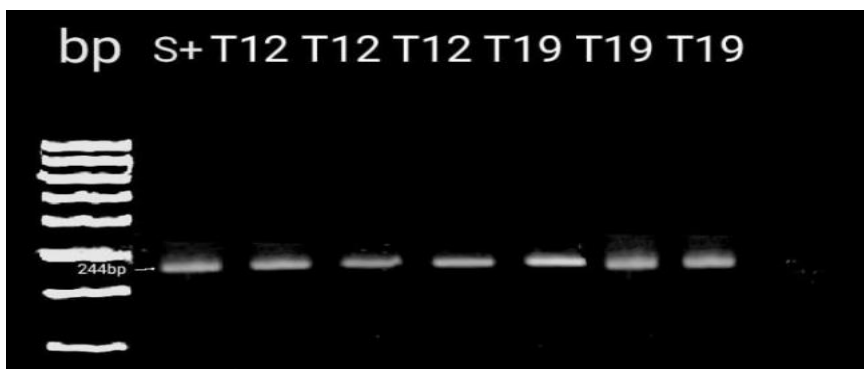


Figura 14. Resultados de electroforesis después de realizar PCR con los aislados de *Salmonella spp*. donde pb es el marcador de peso molecular S+ es el control positivo y T son las muestras de ADN.

Tabla 33. Resultados de ADN extraído y analizado mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de *Listeria monocytogenes*.

Aislados de <i>Listeria</i>		Nanodrop
Código	ng/μL	PCR
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 34 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.

3.3.4 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 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 número 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 presencia de estos microorganismos patógenos puede llevar a un estado de enfermedades gastrointestinales y en casos más delicados síndrome hemolítico urémico (SUH/SU) 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 (2023), las personas que consuman una agua mal tratada ya sea de diferentes fuentes tanto embotellada, potable, de rios o riachuelos corren el riesgo de infectarse con la toxina de *Escheriachia coli* mismos que es productor de la toxina shiga (STEC).

3.4 Comprobación de la hipótesis

3.4.1 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.

$$H_0: \mu_1 = \mu_1$$

3.4.2 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.

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

3.4.3 *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.

CAPÍTULO IV

4 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

Mediante los análisis microbiológicos, utilizando medios de cultivo específicos, fue posible identificar los microorganismos en estudio, cuantificados en UFC/100 mL. Se detectó contaminación en las marcas de agua embotellada T1, T2, T12, T16, T17 y T19 con *Listeria monocytogenes*, alcanzando un 54,5 % (6/11) de las muestras. Asimismo, las marcas T1, T10, T17 y T19 presentaron *Escherichia coli*, con un 36 % (4/11), mientras que *Salmonella spp.* se identificó en T12 y T19 con un 18 % (2/11). Estos resultados superan los límites establecidos en la norma NTE INEN 2200-2017. En contraste, las marcas T7, T9, T11 y T18 no mostraron crecimiento de ninguno de los patógenos evaluados, cumpliendo con los estándares normativos.

La presencia de microorganismos patógenos también se contrastó mediante la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), la cual ofrece una confiabilidad del 99,9 % y se considera una prueba confirmatoria. Los patógenos detectados en medios selectivos fueron tipificados por serotipo a través del análisis de secuencias, confirmando la presencia de *E. coli* O157:H7, así como de especies pertenecientes a los géneros *Listeria* y *Salmonella*.

El procedimiento de análisis microbiológico y confirmación microscópica (tinción de Gram) para la detección de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.* y *Escherichia coli* requirió un tiempo

aproximado de 9 días, incluyendo incubación, lectura de placas, cuantificación en UFC/100 mL, tinción de Gram y purificación de los aislados. En cambio, el proceso de PCR presentó una duración de 1 día, contemplando la extracción de ADN, su amplificación en termociclador y la visualización por electroforesis, demostrando que la detección molecular es significativamente más rápida que la microbiológica.

4.2 Recomendaciones

Se recomienda utilizar placas Petrifilm, ya que estas contienen los nutrientes necesarios y el tinte indicador, lo que facilita la identificación de los microorganismos, a diferencia de los medios de cultivo convencionales que requieren mayor tiempo de preparación.

Es aconsejable realizar análisis microbiológicos de manera constante, ya sea por lotes o directamente al agua que ingresa a la empresa, con el fin de verificar sus condiciones. Además, se debe asegurar el mantenimiento preventivo y correctivo de los equipos empleados en el tratamiento del agua embotellada, así como la capacitación continua del personal en Buenas Prácticas de Manufactura (BPM).

La aplicación de técnicas de biología molecular, como la PCR, permite obtener resultados en tiempos reducidos, con una efectividad del 99,9 %, mientras que el uso de medios de cultivo tradicionales ofrece alrededor del 70 % de efectividad y requiere un mayor tiempo de análisis.

Para la determinación de microorganismos patógenos en agua embotellada se recomienda priorizar el uso del método de PCR, dado

que ofrece mayor rapidez y efectividad en comparación con los medios selectivos convencionales.

GLOSARIO

Agar: Polisacárido obtenido de algas rojas, utilizado como agente solidificante en medios de cultivo microbiológicos.

Aislamiento Microbiano: Proceso mediante el cual se separa un microorganismo de una población mixta, con el fin de obtener cultivos puros.

Bioseguridad: Conjunto de normas, prácticas y medidas destinadas a minimizar el riesgo de contaminación biológica en el laboratorio, protegiendo al personal, al ambiente y a las muestras.

Cepas: Conjunto de células descendientes de una única célula microbiana, que mantienen características genéticas y fenotípicas comunes, utilizadas en estudios, investigación o como referencia.

Colonia Bacteriana: Conjunto visible de bacterias que se desarrollan a partir de una sola célula en un medio sólido, presentando características específicas de forma, color y textura.

Electroforesis: Técnica analítica que permite separar moléculas (como proteínas o ácidos nucleicos) en función de su tamaño y carga eléctrica, mediante la aplicación de un campo eléctrico en un medio soporte (gel).

Estría: Técnica de siembra microbiológica realizada en placas Petri, con el objetivo de aislar cepas puras a partir de una muestra contaminada, mediante el arrastre progresivo de inóculo.

FDA (Food and Drug Administration): Agencia del gobierno de los Estados Unidos encargada de regular alimentos, medicamentos,

cosméticos, equipos médicos y productos biológicos, garantizando su inocuidad y eficacia.

Índol: Compuesto heterocíclico de naturaleza orgánica, producto de la descomposición del triptófano por acción de la enzima triptofanasa. Su detección es una prueba bioquímica usada para identificar bacterias entéricas.

Inóculo: Material biológico que contiene microorganismos viables y que se transfiere a un medio de cultivo para su propagación

M.O. (Microorganismo): Ser vivo microscópico (bacterias, hongos, virus, protozoos) que puede ser unicelular o multicelular, algunos beneficiosos y otros patógenos para el ser humano, animales o alimentos.

Medios de cultivo: Preparados que contienen nutrientes, sales minerales, agentes selectivos o diferenciales, diseñados para favorecer el crecimiento de microorganismos y permitir su aislamiento e identificación.

Norma INEN-ISO: Estándares técnicos establecidos por el Instituto Ecuatoriano de Normalización en concordancia con la Organización Internacional de Normalización (ISO), aplicados en análisis de calidad e inocuidad.

PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa): Técnica de biología molecular que permite amplificar fragmentos específicos de ADN, facilitando la detección rápida y precisa de microorganismos patógenos.

Tinción de Gram: Método de tinción diferencial que clasifica bacterias en Gram positivas (pared celular gruesa de peptidoglucano) y Gram negativas (pared celular delgada con membrana externa lipídica).

UFC (Unidades Formadoras de Colonia): Medida utilizada en microbiología para estimar el número de bacterias viables en una muestra, basada en el conteo de colonias formadas en un medio sólido.

BIBLIOGRAFÍA

- Agboola, T., & Bisi, M. (2023). Occurrence of *Listeria monocytogenes* in irrigation water and irrigated vegetables in selected areas of Osun State, Nigeria. *Scientific African*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2022.e01503>
- ARCSA. (2020). Plantas purificadoras: Realidad del agua embotellada en Ecuador.
- ARCSA. (2021). ARCSA y Fiscalía toman muestras en Santa Rosa tras intoxicación masiva por agua contaminada. Obtenido de <https://www.edicionmedica.ec/secciones/salud-publica/arcsa-y-fiscalia-toman-muestras-e-inician-investigaciones-en-santa-rosa-tras-intoxicacion-masiva--97132>
- Aytaç, E., & et al. (2024). Reverse osmosis membrane engineering: multidirectional analysis using bibliometric, machine learning, data, and text mining approaches. *Membranes*, 14(12). doi:<https://doi.org/10.3390/membranes14120259>
- Barcia, X. (2024). *Agua*. Obtenido de https://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/175693/Documento_completo.pdf?sequence=1
- Barrera, K. (2019). Siembra por picadura y estría en la superficie. Obtenido de <https://www.studocu.com/ec/document/escuela-superior-politecnica-de-chimborazo/microbiologia-y-parasitologia/tecnicas-de-siembra-para-microbiologia/26754496>

- Bogiel, T., & et al. (2024). The use of gel electrophoresis to separate Multiplex Polymerase Chain Reaction amplicons allows for the easy identification and assessment of the spread of toxigenic clostridioides difficile strains. *Gels*. Obtenido de <https://doi.org/10.3390/gels10120818>
- Bonnet, M., & et al. (2020). Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in clinical microbiology. *New microbes and new infections*, 34. doi:<https://doi.org/10.1016/j.nmni.2019.100622>
- Britania Lab. (2021). Agar para cultivos. Obtenido de https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_6070756160103.pdf
- Byram, M. (2021). Informe de calidad del agua embotellada. Obtenido de premiumwaters.com/wp-content/uploads-2018-05-2021-Byram-CCR-MS-Purified-Water-Spanish_.pdf
- Caycedo, L., & et al. (2020). Requerimientos nutricionales y medios de cultivo. *Scielo*. Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v19n36/1794-2470-nova-19-36-49.pdf>
- Cedeño , J., & et al . (2020). Microbiología médica . Obtenido de <https://mawil.us/wp-content/uploads/2020/03/microbiologia-medica.pdf>
- Centros para el control y la prevención de enfermedades. (2022). La Salmonella y los alimentos. *CDC*. Obtenido de

<https://www.cdc.gov/foodsafety/es/communication/salmonella-and-food-sp.html>

Chila , K., & et al. (2024). Microorganisms in water for daily consumption on Luis Vargas Torres Island in the city of Esmeraldas. *Salud, Ciencia y Tecnología – Serie de Conferencias*. doi:<https://doi.org/10.56294/sctconf2023558>

Concha, M., & et al. (2024). Calidad de agua embotellada de consumo humano en el Ecuador y su impacto en la salud de la población. *Revista Científica Arbitrada Multidisciplinaria PENTACIENCIAS*. Obtenido de ISSN:2806-5794

Dahal, P. (2025). Streak Plate Method: Principle, Types & Step-by-Step Guide. Obtenido de <https://microbenotes.com/streak-plate-method-principle-methods-significance-limitations/>

Dirección General de Salud. (2017). *Parámetros organolépticos y físico químico del agua*.

Equipos y Laboratorio de Colombia S.A.S . (2022). Técnicas básicas para el cultivo de microorganismos: siembra y estudio de bacterias. Obtenido de <https://www.equiposylaboratorio.com/portal/articulo-ampliado/tEcnicas-bAsicas-para-el-cultivo-de-microorganismos:-siembra-y-estudio-de-bacterias>

Estupiñán, G., & et al. (2025). Influencia del tipo y color del envase (Botellón) en la preservación del agua embotellada. *Recimundo*. doi:[https://doi.org/10.26820/recimundo/9.\(2\).abril.2025.526-535](https://doi.org/10.26820/recimundo/9.(2).abril.2025.526-535)

- Figuerola, Y., & et al. (2023). Estudio epidemiológico y serotipificación por PCR múltiple de *Listeria monocytogenes* aislada de matrices alimentarias en Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ram.2023.05.004>
- Flores, P., & et al. (2024). Automatización de inoculación en medios de cultivo para el laboratorio de microbiología. *Revista de ciencias tecnológicas*. doi:<https://doi.org/10.37636/recit.v6n4e285>
- German, G. (2022). Metodos De Siembra.
- Gil, M. (2025). Medio de cultivo enriquecido. Obtenido de <https://www.lifeder.com/medio-de-cultivo-enriquecido/>
- Gomes, L., & et al. (2024). Characterization of *Escherichia coli* Isolates in Recreational Waters: Implications for Public Health and One Health Approach. *Water*, 16(18). doi:<https://doi.org/10.3390/w16182695>
- 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. doi:<https://doi.org/10.3390/microorganisms10061214>
- Him, J., & Vásquez, D. (2022). Evaluación de coliformes y factores físico- químicos del agua en un sector de la desembocadura del río san pablo, veraguas, Panamá. *Centros: Revista Científica Universitaria*. Obtenido de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=9567440>
- INEC & UNICEF . (2018). Agua, saneamiento e higiene: medición de los ODS en Ecuador. Obtenido de

https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Bibliotecas/Libros/AGUA,_SANEAMIENTO_e_HIGIENE.pdf

Insumolab. (2018). Agar Chocolate . Obtenido de https://www.insumolab.cl/descargas/area_clinica/placas_90mm/ficha_tecnica/10.pdf

Irala, R., & Ramos , P. (2022). Percepción de los consumidores de agua embotellada con relación a su calidad, Paraguay (2020). *Revista de salud publica del Paraguay*. doi:<https://doi.org/10.18004/rspp.diciembre.13>

ISO-9308-1. (2019). Recuento de E. coli y coliformes por filtración por membrana. Obtenido de https://www.analisisavanzados.com/modules/mod_tecdata/Aguas%20-%20E%20coli%20coliformes%20UNE-EN%20ISO%209308-1-2014.pdf

Jiménez, M., & et al. (2024). Comparación de medios de cultivo para la detección de Legionella spp. en muestras de agua sanitaria: adaptación a la norma ISO 11731:2017. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.eimc.2024.03.013>

Lino, W., & Reyes, G. (2024). Fase preanalítica y calidad en la gestión de muestras biológicas para el diagnóstico en el laboratorio clínico. *Revista Científica de Salud BIOSANA*. doi:<https://doi.org/10.62305/biosana.v4i2.189>

Llanos, F., & Condo, A. (2022). *Ozonificación en Aguas Embotelladas*.

- López-Jácome, L. E. (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investigación en Discapacidad*, 3(1), 10-18. Obtenido de <https://www.medigraphic.com/pdfs/invd/ir-2014/ir141b.pdf>
- Martín, I. (2023). Aporte de nitratos procedente del agua embotellada. Obtenido de <https://riull.ull.es/xmlui/bitstream/handle/915/36734/Aporte%20de%20nitratos%20procedentes%20del%20agua%20embotella da.pdf?sequence=1>
- Maruf , M., & Rahman, S. (20 de Febrero de 2024). Salmonella in the environment: A review on ecology, antimicrobial resistance, seafood contaminations, and human health implications. *Journal of Hazardous Materials Advances*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.hazadv.2024.100407>
- Meghdadi, H., & et al. (2019). Isolation and characterization of *Listeria monocytogenes* from environmental and clinical sources by culture and PCR-RFLP methods. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30996825/>
- Natalia, K., & et al. (2022). Detección de *Salmonella* Spp. *Escherichia coli* *Listeria monocytogenes* en Atún por PCR Multiplex. *Journal of Aquaculture and Fish Health*, 11(3). doi:<https://doi.org/10.20473/jafh.v11i3.36509>
- NEUQUEN. (2021). *Siembras en cajas de Petri por la Técnica de siembra masiva*. NEUQUEN. Obtenido de <https://www.saludneuquen.gob.ar/wp->

content/uploads/2021/08/ANAL-005-Microbiologia-general.pdf

NTE INEN 2200. (2017). *Agua Purificada Envasada. Requisitos*.
Obtenido de <https://es.scribd.com/document/441048597/Inen-2200-2>

Núñez, D., & Bayas, F. (2019). Prevalencia de Salmonella Spp. y Escherichia Coli en agua de consumo humano en Ecuador.
Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/336141576_PREVALENCIA_DE_SALMONELLA_SPP_Y_ESCHERICHIA_COLI_EN_AGUA_DE_CONSUMO_HUMANO_EN_ECUADOR

Núñez, D., & Bayas, F. (2020). Detection of Salmonella spp. and Listeria spp. in drinking water in Ecuador. *Baltica*. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/358634953_Detection_of_Salmonella_spp_and_Listeria_spp_in_drinking_water_in_Ecuador_Recovery_of_Waste_Cooking_Oil_Used_in_the_Biodiesel_Production_in_Ecuador_View_project_Edison_rivelino_Ramon_Detection_of_Salm

OMS. (2018). Guías para la calidad del agua de consumo humano.
Obtenido de apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/272403/9789243549958-spa.pdfua=1

- OMS. (2023). Agua para consumo humano. Obtenido de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/drinking-water>
- 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. (2022). Peligros biológicos. Obtenido 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
- Ortega, N., & Gutiérrez, J. (2020). Índice de consumo de agua en laboratorios de analítica, microbiología y protección de materiales de la empresa CNIC. *Revista CENIC Ciencias Químicas*. Obtenido de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2221-24422020000200252
- Osek, J., & et al. (2022). *Listeria monocytogenes* in foods—From culture identification to whole-genome characteristics. *Food Science and Nutrition*. doi:<https://doi.org/10.1002/fsn3.2910>
- Peralta, J. (2022). El agua una sustancia. *Academia Mexicana De Ciencias*, na. Recuperado el 5 de septiembre de 2022
- Poincare, R. (2019). Sabouraud Agar. Agar/medio para el aislamiento de hongos . Obtenido de https://commerce.bio-rad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/es/56524_2019_07_ES.pdf

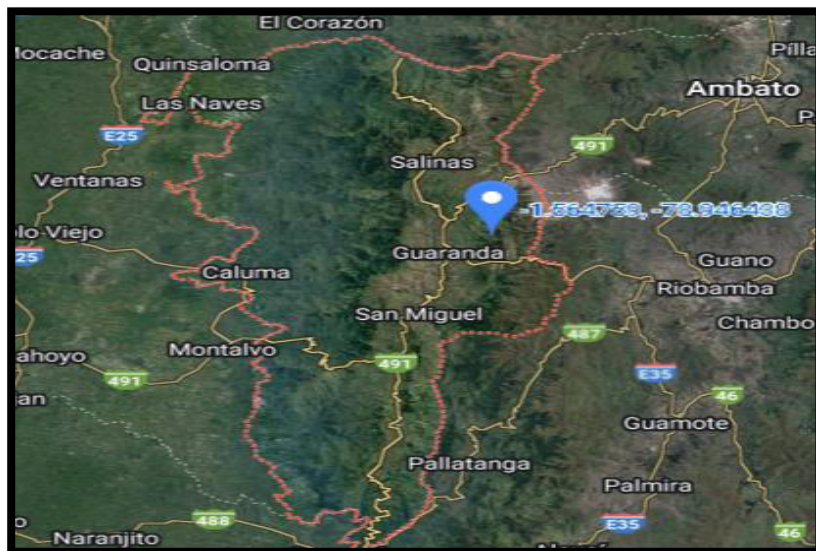
- Prieto. (2022). Medios de cultivos para bacterias. Agar MacConkey. Obtenido de <https://medicoplus.com/ciencia/medios-cultivo-bacterias>
- Quenta, A. (2020). Siembra por estría, en tubos de agar inclinado . Obtenido de <https://www.studocu.com/pe/document/universidad-privada-de-tacna/microbiologia/tipos-de-siembra-microbiologia/9019969>
- Quinto, E., & et al. (2019). Food Safety through Natural Antimicrobials. *Antibiotics*. doi:<https://doi.org/10.3390/antibiotics8040208>
- Relief. (de de 2017). *reliefweb*. Recuperado el 21 de Octubre de 2022
- Reynoso. (2022). Siembra en picadura o punción. Cultivos en medio sólido. Obtenido 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
- Reynoso, M., & Magnoli, C. (2022). Cultivos en medios sólidos. Obtenido 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

- Rossi, A. (2021). *Agar verde brillante*. Obtenido de 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
- RTE INEN 055. (2011). Aguas envasadas. Requisitos . Obtenido de [https://www2.aladi.org/nsfaladi/normasTecnicas.nsf/09267198f1324b64032574960062343c/cfdf5e0f9fe8566c032579de005f938a/\\$FILE/Resoluci%C3%B3n%20N%C2%B0%2011182-2011.pdf](https://www2.aladi.org/nsfaladi/normasTecnicas.nsf/09267198f1324b64032574960062343c/cfdf5e0f9fe8566c032579de005f938a/$FILE/Resoluci%C3%B3n%20N%C2%B0%2011182-2011.pdf)
- Saleem, D., & et al. (2022). Detection of Salmonella spp. by Traditional and PCR Assays in Raw Milk, Maysan, Iraq. *Archives of Razi Institute*. doi:<https://doi.org/10.22092/ARI.2022.359086.2369>
- Sánchez, S., & Guangasig, V. (2023). Calidad microbiológica del agua de consumo humano: La realidad en el Ecuador. *Revista Latinoamericana de Ciencias Sociales y Humanidades*. doi:<https://doi.org/10.56712/latam.v4i2.690>
- Santos, A. (14 de Diciembre de 2022). Control de calidad microbiológico de bioplaguicidas a base de agentes de control biológico . Obtenido de <https://repository.agrosavia.co/server/api/core/bitstreams/0469ef52-635e-468d-b530-a4e9aa50b936/content>

- Schumacher, A., & et al . (2021). Validation of the 3M™ Petrifilm™ Coliform Count Plate for Enumeration of Coliforms in Bottled Water: AOAC Performance Tested MethodSM 082101. *Journal of AOAC International*. doi:<https://doi.org/10.1093/jaoacint/qsab137>
- Some, S., & et al. (2021). Microbial pollution of water with special reference to coliform bacteria and their nexus with environment. *Energy Nexus*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.nexus.2021.100008>
- Soria, M., & Vilca, M. (Diciembre de 2025). Comparación del agar sangre de carnero y humano para el crecimiento y la expresión hemolítica de bacterias patógenas. *Revista Hispanoamericana De Ciencias De La Salud*, 11(4). doi:<https://doi.org/10.56239/rhcs.2025.114.1041>
- Tarazona, Y. (2022). Calidad del agua para consumo humano y su relación con enfermedades gastrointestinales en niños menores de 5 años en el distrito de San Nicolás - Carlos Fermín Fitzcarrald, 2021. Obtenido de https://alicia.concytec.gob.pe/vufind/Record/RUNM_6f0efade86a2a6e90c63c365e862f451
- ThermoFisher. (2025). *DNA and RNA Extraction and Purification*. Obtenido de <https://www.thermoFisher.com/ec/en/home/life-science/dna-rna-purification-analysis.html>
- Truque , P. (2018). *Armonización de los estándares de agua potable en las Américas*. OAS. Obtenido de www.oas.org-publications-classifications-Armoniz.EstandaresAguaPotable.

- Uddin, R., & et al. (2021). Quality assessment of bottled and unbottled drinking water in Bangladesh. *Water*. doi:<https://doi.org/10.3390/w13152026>
- 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>
- Villa, M. (2022). *utpl.edu.ec*. Recuperado el de de 2022, de utpl.edu.ec/carreras/calidad-del-agua
- 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>
- Yepes, M., & et al. (2022). Validación de PCR convencional para detectar E.coli O157. *Información Tecnológica*. doi:<http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642022000200003>
- Yousef, S., & et al. (2022). Development of a novel selective medium for culture of Gram-negative bacteria. *BMC Research Notes*. doi:<https://doi.org/10.1186/s13104-021-05628-2>
- Zepeda , L., & Tello, J. (2025). Agua embotellada: contemplaciones sanitarias entre el derecho humano a la salud y la industria privada. *Cuestiones constitucionales*. doi:<https://doi.org/10.22201/ijj.24484881e.2025.52.19558>

Anexo 1. Mapa de ubicación de la investigación

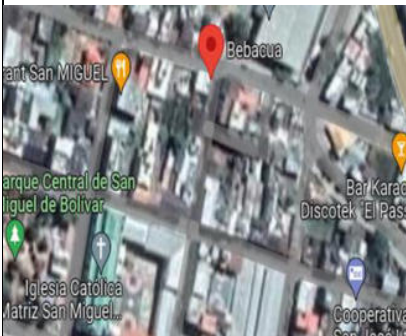


Anexo 2. Formatos de fichas de recolección de datos.

UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLÍVAR					
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS RECURSOS NATURALES Y DEL AMBIENTE					
CARRERA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL					
Ficha De Recolección De Datos					
Código	Lugar de origen	Contenido neto	Cantón de muestreo	Hora y Fecha	Marca
T1					
T2					
T3					
T4					
T5					
T6					
T7					
T8					

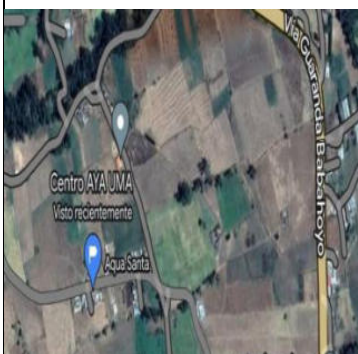
T9					
T10					
T11					
T12					
T13					
T14					

Anexo 3. Georreferenciación

Cantón San Miguel, Empresa embotelladora BEBACUA.	
	
San José de Chimbo, Empresa embotelladora AQUA PURITECH.	



Guaranda, Empresa embotelladora Aqua Santa, Parroquia Santa Fe



Anexo 4. Análisis físico-químicos

DQO, Demanda Química De Oxígeno



Digestor de DQO



Espectrofotómetro HACH

Dureza



Turbiedad

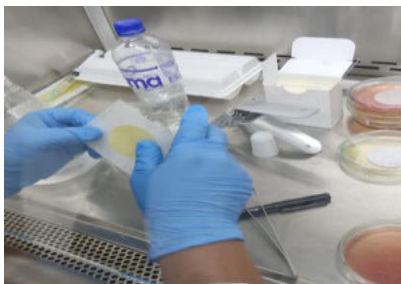


Medidor de pH

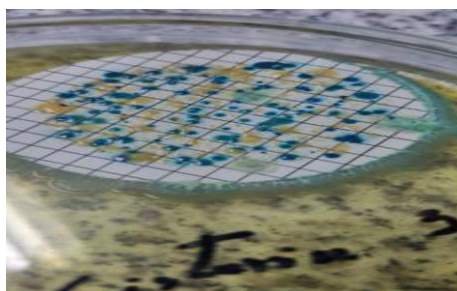
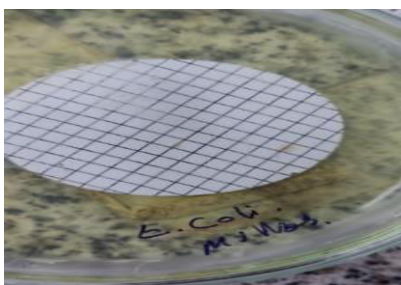


Anexo 5. Análisis microbiológicos.

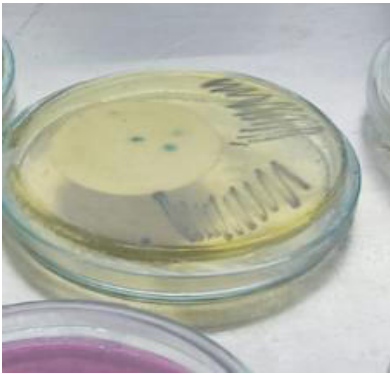
Preparación de medios de cultivo selectivos	
	
	
Filtración de muestras mediante membrana y siembra en medios selectivos	



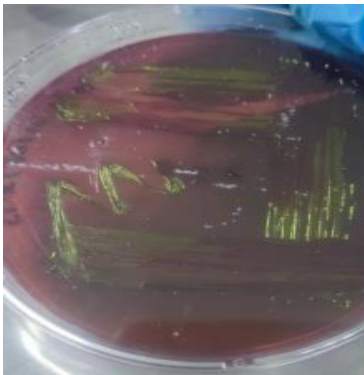
Lectura de muestras



XLD-Samonella



Agar EMB levine-*E.coli*

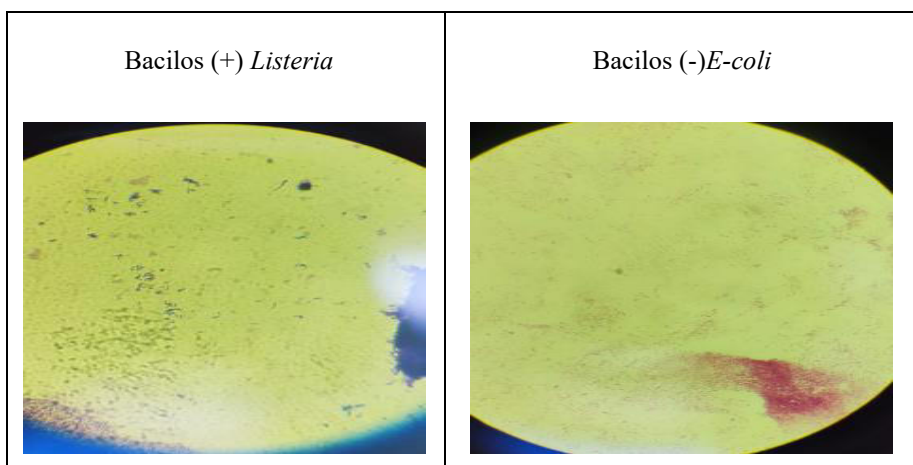


Agar Chromogenic *Listeria*



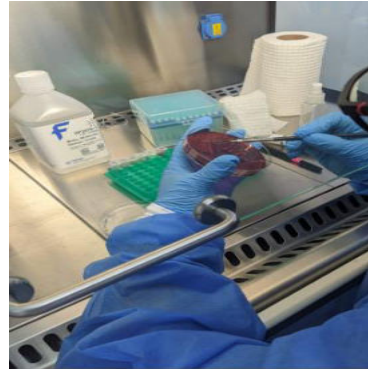
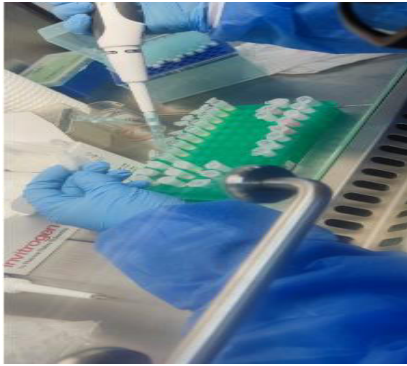
Tincion de gram



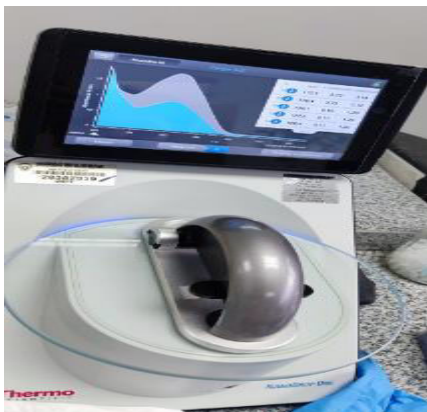


Anexo 6. Extracción de ADN mediante mini kit y electroforesis.

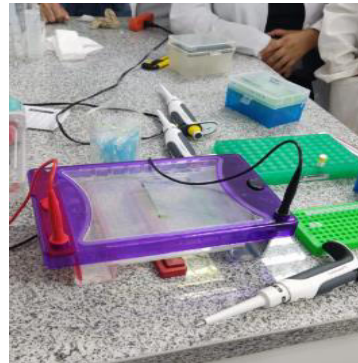


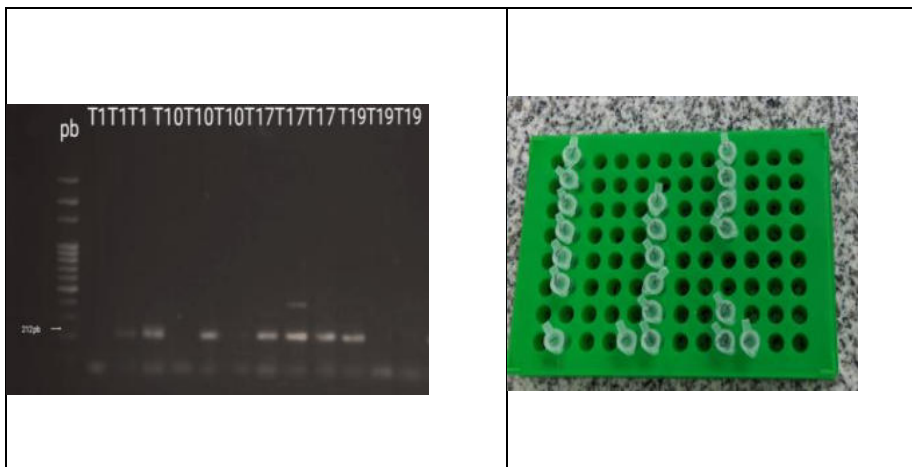


Lectura de ADN en Nanodrop



Amplificación de ADN extraído







Calidad del agua embotellada en la provincia Bolívar a través de análisis biomoleculares (pcr) y cultivos microbiológicos, se publicó en el mes de diciembre de 2025.

ISBN: 978-9907-0-0501-1

**Editorial InvestiGo
Riobamba – Ecuador
Cel: +593 97 911 9620
publicaciones@grupoblr.com**

BIOGRAFÍA DE LOS AUTORES

Darwin Alberto Núñez Torres:

Darwin Alberto Núñez Torres es profesor en la Universidad Estatal de Bolívar, Ecuador, especializado en biología molecular, biotecnología y análisis de alimentos. Ha participado en investigaciones sobre la detección de patógenos en agua potable mediante PCR y la extracción de aceites esenciales de cáscara de naranja. Además, ha explorado el desarrollo de barras de chocolate y la deshidratación de variedades de ají para obtener polvo.

Sandra Patricia Iza Iza:

Docente Principal de la Universidad Estatal de Bolívar. Carrera de Agroindustria. Doctora en Investigación Interdisciplinaria. Universidad Anáhuac-México. Máster en Agroindustria y Negocios. UTA. Ingeniera en Alimentos. UTA. Especialidad en Elaboración de Proyectos de Investigación Científica. UTA Diploma en Aseguramiento y control de la calidad. UTA Investigadora en el proyecto de Investigación con el SENACYT. Autora y Directora de Proyectos de Investigación de la UEB. Investigadora de Proyectos de investigación de la UEB. Realizo trabajos de Investigación encaminados a combatir la desnutrición y mejorar la salud.

Herminia del Rosario Sanaguano Salguero:

Herminia del Rosario Sanaguano Salguero, estudió en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Especialista en Docencia Universitaria en la Universidad de Nariño – Colombia, Doctora en Ciencias Ambientales en la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Docente de la Universidad Estatal de Bolívar y actualmente cumpla las funciones del Vicerrectorado Académico.

Carlos Roberto Moreno Mejía:

Profesor titular a tiempo completo en la Universidad Estatal de Bolívar, con los siguientes grados académicos: Doctor (PhD) en Investigación Interdisciplinaria, Magister en Agroindustria y Negocios. Especialista en Proyectos de Investigación Científica y Tecnológica. Ingeniero en Alimentos. Director y Codirector de Proyectos de Investigación con Fondos concursables SENESCYT y Fondos UEB. 29 años de experiencia académica como Docente – Investigador en el área de Cálculos Básicos de Ingeniería, Operaciones Unitarias, Procesos Tecnológicos y Diseño Desarrollo de Nuevos Productos. Director de trabajos de titulación de pregrado y posgrado. Autor y co-autor de varias publicaciones de artículos científicos en revistas indexadas.

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

Estimado lector, el proyecto investigativo titulado “La calidad del agua embotellada en la provincia Bolívar a través de análisis biomoleculares (PCR) y cultivos microbiológicos” tuvo como finalidad analizar la calidad microbiológica del agua embotellada producida por diferentes empresas de la provincia mediante dos metodologías complementarias: medios de cultivo específicos para el desarrollo de microorganismos y técnicas de biología molecular (PCR en tiempo final).

Se planteó un diseño completamente al azar (DCA) con arreglo factorial A x B (5 x 2) y tres repeticiones, evaluándose un total de 11 marcas de agua embotellada mediante cultivos selectivos y diferenciales expresados en UFC/mL, además de cebadores específicos de la marca Invitrogen para la detección de genes de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. y *Escherichia coli* O157:H7, utilizando como referencia controles positivos.

Los resultados evidenciaron la presencia de *Listeria monocytogenes* en el 54 % (6/11) de las muestras, *Escherichia coli* en el 36 % (4/11) y *Salmonella* spp. en el 18 % (2/11), siendo la técnica de PCR más sensible y precisa en la detección de *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes*, lo que confirma los hallazgos obtenidos con los controles positivos. En conclusión, la detección de estas bacterias patógenas en agua embotellada representa un riesgo significativo para la salud y bienestar de los consumidores, por lo que resulta fundamental aplicar un control microbiológico riguroso en la producción y comercialización de este producto.



Editorial InvestiGo
Riobamba – Ecuador
Cel: +593 97 911 9620
publicaciones@grupoblrc.com

ISBN: 978-9907-0-0501-1

