



# UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

FACULTAD DE LA SALUD HUMANA

CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

## TÍTULO

ESTUDIO BACTERIOLÓGICO DE CINCO MARCAS DE  
AGUA EMBOTELLADA SIN GAS, EXPENDIDAS EN LA  
CIUDAD DE LOJA

*Tesis previa a la obtención  
del título de Licenciada en  
Laboratorio Clínico*

AUTORA:

*Andrea Ivánova Angamarca Bautista*

DIRECTORA:

*Dra. Elsa Cumandá Ramírez Sanmartín, Mg. Sc.*

LOJA – ECUADOR  
2018



## Certificación

**Dra. Elsa Cumandá Ramírez Sanmartín, Mg. Sc.**

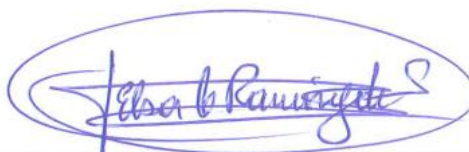
**DIRECTORA DE TESIS**

**Certifica:**

Que la presente tesis titulada: **Estudio bacteriológico de cinco marcas de agua embotellada sin gas, expendidas en la ciudad de Loja**, de autoría de la Srta. Andrea Ivanova Angamarca Bautista previo a la obtención del título de Licenciada en Laboratorio Clínico, ha sido supervisada y elaborada bajo mi dirección, por lo que certifico que cumple con los requisitos establecidos por el Reglamento de Régimen Académico de la Universidad Nacional de Loja y una vez revisada autorizo su presentación ante el tribunal correspondiente.

Loja, 9 de julio del 2018

Atentamente,



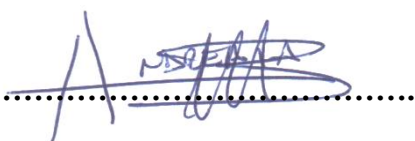
**Dra. Elsa Cumandá Ramírez Sanmartín, Mg. Sc.**

**DIRECTORA DE TESIS**

### **Autoría**

Yo, Andrea Ivanova Angamarca Bautista declaro ser autora del presente trabajo de tesis, titulado: “Estudio bacteriológico de cinco marcas de agua embotellada sin gas, expendidas en la ciudad de Loja”. Y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes Jurídicos de posibles reclamos o acciones legales, por el contenido de la misma.

Adicionalmente acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja, la publicación de mi tesis en el Repositorio Institucional – Biblioteca Virtual.

**Firma:**.....

**Autora:** Andrea Ivanova Angamarca Bautista

**Cédula:** 1104133721

**Fecha:** 9 de julio del 2018


## Carta de Autorización

Yo, Andrea Ivanova Angamarca Bautista, declaro ser autora de la tesis titulada: “Estudio bacteriológico de cinco marcas de agua embotellada sin gas, expendidas en la ciudad de Loja” como requisito para optar al grado de Licenciada en Laboratorio Clínico; autorizo al sistema bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que con fines académicos muestre al mundo la producción intelectual de la Universidad, a través de la visibilidad en su contenido de la siguiente manera en el Repositorio Digital Institucional.

Los usuarios pueden consultar el contenido de este trabajo en el RDI, en las redes de información del país y del exterior, con las cuales tengan convenio la Universidad.

La Universidad Nacional de Loja no se responsabiliza por el plagio o copia de la tesis que realice un tercero.

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja, a los nueve días del mes de julio del dos mil dieciocho, firma la autora.

Firma: 

**Autora:** Andrea Ivanova Angamarca Bautista

**Cédula:** 1104133721

**Dirección:** Barrio Turunuma Alto

**Correo electrónico:** andrea.angamark@yahoo.es

### DATOS COMPLEMENTARIOS

**Directora de tesis:** Dra. Elsa Cumandá Ramírez Sanmartín, Mg. Sc.

**Tribunal de grado:**

**Presidente:** Dr. Luis Alberto Morocho Yaguana, Mg. Sc.

**Vocal:** Dra. Diana Alexandra Montaña Peralta, Mg. Sc.

**Vocal:** Lic. Iliana Alicia Delgado, Mg. Sc.

## **Dedicatoria**

El presente trabajo va dedicado a mi familia que ha sido el pilar fundamental para seguir adelante. A mamá y papá por el esfuerzo, sacrificio y amor diario; y a mis hermanos por el apoyo y las risas en los momentos de angustia con la tesis. Los amo

*Andrea Ivanova Angamarca Bautista*

## **Agradecimiento**

A la Universidad Nacional de Loja, a la Facultad de la Salud Humana, a la Carrera de Laboratorio Clínico; y a todos los Docentes que de manera humana y profesional me impartieron sus conocimientos.

A mi directora de tesis la Dra. Elsa Ramírez Sanmartín Mg. Sc., por su dirección, su tiempo y las instrucciones que oportunamente supo brindarme para que el presente sea culminado satisfactoriamente.

A la Universidad Nacional de Loja y al Dr. Luis Morocho, por la ayuda brindada para que pueda desarrollar la parte práctica de mi proyecto de tesis.

## Índice

Carátula.....	i
Certificación.....	ii
Autoría .....	iii
Carta de Autorización .....	iv
Dedicatoria.....	v
Agradecimiento.....	vi
Índice .....	vii
1. Título.....	1
2. Resumen.....	2
Summary.....	3
3. Introducción .....	4
4. Revisión de la Literatura.....	6
4.1 Agua.....	6
4.2 Agua Potable .....	7
4.3 Agua Envasada.....	7
4.4 Métodos de Purificación del Agua.....	9
4.5 Regulación del Agua Envasada.....	10
4.6 Indicadores Microbiológicos de Calidad del Agua.....	10
4.7 Fundamento de la Técnica de Filtración de Membrana.....	11
4.8 Métodos Rápidos para la Enumeración de Microorganismos Indicadores.....	12
4.9 Fuentes de Contaminación del Agua .....	14
4.10 Agua Contaminada y su Efecto en la Salud .....	14
5. Materiales y Métodos.....	16
5.1 Tipo de Estudio .....	16

5. 2 Área de Estudio.....	16
5.3 Universo y Muestra.....	16
5.4 Codificación e Identificación de muestras.....	16
5.5 Criterios de Inclusión y Exclusión.....	17
5.6 Métodos, Técnicas y Procedimientos.....	18
5.7 Tabulación y análisis de resultados.....	18
6. Resultados.....	19
7. Discusión.....	22
8. Conclusiones.....	24
9. Recomendaciones.....	25
10. Bibliografía.....	26
11. Anexos.....	33
Anexo 1.- Autorización para el Procesamiento de Muestras.....	33
Anexo 2.- Encuesta Aplicada para la Selección de las Marcas de Agua.....	34
Anexo 3.- Protocolo de Transporte de Muestra.....	36
Anexo 4.- Codificación, identificación y registro de muestras.....	37
Anexo 5.- Determinación de Coliformes Totales y Fecales ( <i>E. coli</i> ).....	39
Anexo 6.- Registro de Resultados.....	45
Anexo 7.- Calculo de Resultados.....	55
Anexo 8.- Certificación de Haber Realizado el Procesamiento de Muestras en el Laboratorio de Análisis Químico del Centro de Investigación de la UNL.....	57
Anexo 9.-Norma INEN-ISO 9308-1: 2014.....	58
Anexo 10.- Certificación de traducción del resumen.....	71



## **1. Título**

**Estudio Bacteriológico de Cinco Marcas de Agua Embotellada sin Gas, Expendidas en la Ciudad de Loja.**

## 2. Resumen

El agua es, en el hombre, el líquido en el que se produce el proceso de la vida, aunque dependemos de ella, nuestro organismo no es capaz de sintetizarla en cantidades suficientes, por lo que debe ingerirse regularmente. En las últimas tres décadas, el consumo de agua embotellada a nivel mundial ha crecido a un ritmo constante, se tiene la percepción de que una vez que el agua es embotellada, el producto es estéril, pero en realidad puede contener grandes cantidades de bacterias, lo cual implica falta de sanitización. El presente estudio de tipo descriptivo y corte transversal, evaluó la calidad bacteriológica de 5 marcas comerciales de agua embotellada sin gas expandidas en la ciudad de Loja, de acuerdo a la norma INEN 2200. La selección se realizó mediante encuesta a los estudiantes de la Facultad de Salud de la Universidad Nacional de Loja; de las marcas elegidas se realizó un muestreo al azar en tiendas de abarrotes ubicadas dentro del casco urbano de la ciudad. Las muestras consistieron en presentaciones de 500 y 750 mL, con fecha de expiración vigente; procesando dos lotes por marca durante el 7 de noviembre del 2017 y 26 de enero del 2018. Se empleó la técnica de filtración de membrana, para detectar los indicadores: *Coliformes Totales* y *E. coli*. Se determinó la presencia de *Coliformes Totales* en 7,5% de las muestras para la marca V y en el 10% de las muestras para la marca C; no se detectó la presencia de *E. coli*.

**Palabras clave:** Evaluación microbiológica, Método de Filtración de Membrana

## Summary

The water is, in the man, the liquid where the life process is produced, although we depend on it, our body is not able to synthesize it in enough quantities, so it has to be ingested regularly. In the last three decades, the consumption of bottled water worldwide has grown steadily, we have the perception that once the water is bottled, the product is sterile, but actually it can contain large amounts of bacteria, which implies lack of sanitization. The current descriptive, cross-sectional study, evaluated the bacteriological quality of five commercial brands of non-carbonated bottled water, expended in the city of Loja, according to INEN 2200 standard. The selection was carried out through a survey applied to the students of the Faculty of Medicine at the “Universidad Nacional de Loja”; from the chosen brands a random sampling was performed in different grocery stores situated inside the urban area of the city. The samples consist of 500 and 750 ml bottles, with valid expiration date; processing two lots per brand during November 7th, 2017 and January 26th, 2018. The membrane filtration technique was used, to detect the indicators: Coliformes Totales and *E. coli*. The presence of Coliformes Totales was determined in a 7,5% of the samples for the brand V and in a 10% of the samples for the brand C; the presence of *E. coli* was not detected.

**Key words:** Microbiological evaluation, Membrane Filtration Method.

### 3. Introducción

El agua es en el hombre, el líquido en el que se produce el proceso de la vida, es fundamental para todas las funciones del organismo y es también su componente más abundante. Nuestro metabolismo proporciona una producción endógena de 350 ml diarios de agua, por lo que se necesita una aportación exógena de 2.150 ml para cubrir las pérdidas. (Carbajal, 2014, p. 71)

El agua embotellada, desde que comenzó a venderse en garrafones de vidrio en 1970 en varias partes del mundo, se ha convertido en un gran negocio apoyado por la moda y el estatus, superando en la última década las expectativas de venta, al alcanzar al año la comercialización de más de 180 mil millones de litros del líquido. (Camarillo, 2015, p. 2)

Por lo general se tiene la percepción de que una vez que el agua es embotellada, el producto es estéril, pero en realidad, el agua que es usada para envasado puede contener grandes cantidades de bacterias, de tal manera que, si no se toman las precauciones sanitarias adecuadas, el agua embotellada puede contener bacterias que se reproducen a concentraciones, que podrían representar un riesgo a la salud (González, Gutierrez, & Grande, 2012, p. 120)

La contaminación en el agua embotellada, ha sido reportada por diferentes autores alrededor del mundo. Estudios indican, que más del 40% de muestras procedentes de seis estados de la India presentaron bacterias heterotróficas (BHT) con más de 100 UFC /mL y de estas el 44% presentaron coliformes totales. Por otro lado, en Londrina-Brasil, se determinó que la presencia de coliformes totales, *Escherichia coli*, *Enterococos fecales*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus spp* y heterotróficos en agua, aumentaba 42,2% por el proceso inadecuado de envasado (Arteaga, 2016, p. 6)

El presente estudio tiene como propósito indagar si las muestras procesadas cumplen o no la normativa vigente para Coliformes totales y *E. coli* generando datos reales para la población consumidora.

La investigación analizó la calidad bacteriológica del agua embotellada, seleccionando 5 marcas de agua mediante encuesta, las cuales se adquirieron en tiendas de abarrotes de la localidad. Se llevaron a cabo dos muestreos durante el mes de noviembre del 2017 y enero del 2018 en el Laboratorio de Análisis Químico de la Universidad Nacional de Loja ubicado en la Reinaldo Espinosa y Av. Pío Jaramillo Alvarado, La Argelia.

## 4. Revisión de la Literatura

### 4.1 Agua

#### 4.1.1. Definición

El agua es “el componente más abundante en la superficie terrestre; forma la lluvia, los ríos y los mares; y de manera fundamental, llega a formar parte constituyente de todos los organismos vivos” (Real academia española [RAE], 2014).

#### 4.1.2. Funciones biológicas en el ser humano

Es el vehículo para el transporte de hormonas, metabolitos en la sangre, y para la excreción de productos de desecho a los pulmones, los riñones, el intestino o la piel para ser eliminados (Carbajal & González, 2012, p. 72).

El agua (aceptando o donando protones) también contribuye al mantenimiento del pH, esencial para la vida, ya que la actividad de muchos procesos, como por ejemplo la actividad enzimática, es pH dependiente (Carbajal & González, p. 75).

Es imprescindible para mantener el volumen celular, un requisito importante para la vida (Carbajal & González, 2012, p. 75).

Actúa como lubricante: la saliva lubrica la boca y facilita la masticación y la deglución, las lágrimas lubrican los ojos y limpian cualquier impureza, el líquido sinovial baña las articulaciones, y las secreciones mucosas lubrican el aparato digestivo, el respiratorio y el genitourinario (Carbajal & González, 2012, p. 74).

Proporciona flexibilidad, turgencia y elasticidad a los tejidos. El líquido del globo ocular, el cefalorraquídeo, el líquido amniótico y, en general, los líquidos del organismo

amortiguan y nos protegen cuando andamos y corremos (Carbajal & González, 2012, p.71).

Mantiene la temperatura corporal constante, independientemente del entorno y de la actividad metabólica; disipando la carga extra de calor para evitar variaciones de temperatura que podrían ser fatales (Carbajal & González, 2012, p. 76).

#### **4. 2 Agua Potable**

Es aquella suministrada por la red pública de agua, está libre de sustancias y microorganismos que puedan afectar la salud, con características físicas, químicas microbiológicas tratadas a fin de garantizar su aptitud para consumo humano (Servicio Ecuatoriano de Normalización [INEN], 2014, p. 2).

Sin embargo, una gran parte de esta agua se contamina en el trayecto o en el interior de los domicilios, muchas cisternas tienen filtraciones, grietas o huecos que permiten la entrada de insectos y animales portadores de bacterias (Huerta, 2013, p. 41).

#### **4. 3 Agua Envasada**

Es aquella que se destina al consumo humano, se la sella en botellas u otros recipientes sin ingredientes añadidos; excepto agentes antimicrobianos seguros y adecuados como el fluoruro que puede añadirse opcionalmente dentro de ciertas limitaciones especificadas (Administración de medicamentos y alimentos [FDA], 2017).

Se considera agua purificada envasada a las aguas destinadas al consumo humano que sean sometidas a procesos físico químicos como destilación, desionización, ósmosis inversa, de desinfección u otros procesos; sea carbonatada o no (INEN, 2017, p. 2).

### 4.3.1 Tipos de agua envasada

Existen tres categorías de aguas envasadas que se diferencian por sus propiedades naturales o por los potenciales tratamientos a los que son sometidas en las plantas de embotellado:

***Aguas minerales naturales.*** Son aguas subterráneas bacteriológicamente sanas y de composición química constante que se diferencian de las restantes aguas potables:

Por su naturaleza: caracterizadas por su contenido en determinados minerales, oligoelementos y otros componentes.

Por su pureza original: Al residir en un acuífero subterráneo preservado por un perímetro de protección legalmente establecido al respecto (Aneabe, 2016, p. 29).

***Aguas de manantial.*** Son aguas de origen subterráneo que poseen unas características naturales de pureza que permiten su consumo. Se rigen por los criterios de potabilidad de las aguas de consumo público (Aneabe, 2016, p. 30).

***Aguas preparadas.*** Son aquellas que han sido sometidas a tratamientos físico-químicos diversos (ósmosis, ozono, ultravioleta, ...) para hacerlas potables y cumplan, así, los mismos requisitos sanitarios que las aguas de consumo público. Pueden ser:

Aguas potables preparadas: Pueden tener cualquier origen, tanto subterráneo como superficial.

Aguas de abastecimiento público preparadas: Su procedencia es la red pública (Aneabe, 2016, p. 30).



#### 4.4 Métodos de Purificación del Agua

**Desinfección con cloro.** - Puede ser realizada con cloro gaseoso (gas licuado a presión), cal clorada (polvo), hipoclorito de sodio (solución líquida) e hipoclorito de calcio (polvo, gránulos y tabletas). Usar la cantidad necesaria de cloro es fundamental para que una parte quede en el agua, y así se eliminen nuevos gérmenes (Plataforma de conocimiento sobre construcción ambientalmente sostenible de infraestructura en América latina y El Caribe [KPESIC], 2016, p. 8-9).

**Radiación ultravioleta.** El rango de la longitud de onda tiene propiedad germicida, que incide sobre material genético de microorganismos y virus, destruyendo en corto plazo estos patógenos. Esta técnica desinfecta sin producir cambios físicos o químicos en el agua (KPESIC, 2016, p. 11).

**Filtración.** Provoca la remoción de partículas suspendidas y coloidales, a través de un medio poroso. Constituye el último paso en la clarificación del agua, diseñado y operado convenientemente, puede ser un sistema de desinfección del agua (KPESIC, 2016, p. 12-13).

**Ozono.** Como purificador de agua, el ozono es un gas muy efectivo porque descompone los organismos vivos sin dejar residuos químicos que puedan dañar la salud o alterar el sabor del agua (Huerta, 2013, p. 42).

**Ósmosis inversa.** El proceso de ósmosis inversa utiliza una membrana semipermeable que separa y elimina del agua sólidos, sustancias orgánicas, virus y bacterias disueltas en el agua (Huerta, 2013, p. 42).

#### **4.5 Regulación del Agua Envasada**

Se entiende por Buenas Prácticas de Manufactura de Alimentos (BPM) al conjunto de operaciones de higiene y elaboración que incluye recomendaciones sobre procesos, materia prima, producto, instalaciones, equipos y personal con el objetivo de obtener alimentos inocuos, y que establecen los requerimientos mínimos con relación a manejo de instalaciones, recepción y almacenamiento, mantenimiento de equipos, entrenamiento e higiene del personal de limpieza y desinfección, control de plagas, rechazo de productos, control de proveedores y control de calidad (Pepe, 2015, p. 5).

En Ecuador la Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria ARCSA es la institución encargada de realizar permanentemente controles, con el objetivo de garantizar que los establecimientos que comercializan productos de uso y consumo humano cumplan con la normativa sanitaria; lo que incluye a las plantas embotelladoras de agua, que deben cumplir obligatoriamente con procedimientos higiénicos sanitarios que garanticen a los consumidores que en todas las etapas de producción hasta la entrega del producto final se ha aplicado un riguroso y efectivo control (Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria [ARCSA], 2017, párr. 4-5).

#### **4.6 Indicadores Microbiológicos de Calidad del Agua**

Los indicadores microbiológicos de calidad del agua son organismos que tienen un comportamiento similar a microorganismos patógenos. Su presencia determina la existencia de patógenos, permitiendo comparar sus reacciones a cambios de pH y temperatura o aplicación de medios físicos o químicos de desinfección (Ríos, Agudelo, & Gutierrez, 2017, p. 238).

#### 4.6.1 Coliformes totales

El grupo coliforme abarca los géneros *Klebsiella*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* y *Serratia*. Excepto *E. coli* se hallan en grandes cantidades en el ambiente (fuentes de agua, vegetación y suelos), no necesariamente se los asocia con la contaminación fecal ya que no representan un riesgo evidente para la salud. Las bacterias coliformes, no deben estar presentes en sistemas de abastecimiento, almacenamiento y distribución de agua, y si así ocurriese, ello es indicio de que el tratamiento fue inadecuado. Se ha demostrado que las especies de *Enterobacter* y *Klebsiella* colonizan con frecuencia las superficies interiores de las cañerías de agua y tanques de almacenamiento (Marchand, 2011, párr 12).

#### 4.6.2 Coliformes fecales

Son aquellos provenientes de la materia fecal, de los cuales su habitat natural es el intestino tanto de humanos como de animales, comparten características con los coliformes totales y otras como lo son: Crecen con lactosa y la fermentan a  $44.5^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  produciendo ácido y gas en las primeras 48h de incubación. El género *E. coli* es el más ampliamente utilizado como indicador de contaminación en la calidad del agua, ya que es el más específico determinante de contaminación fecal (Rosas Ronzón, 2013, p. 22).

### 4.7 Fundamento de la Técnica de Filtración de Membrana

Se basa en la filtración de una muestra de agua para concentrar células (bacterias) viables sobre la superficie de membrana y transferirlas a un medio de cultivo apropiado para contar el número de unidades formadoras de colonias (UFC) desarrolladas luego de un período de incubación. La técnica de filtración por membrana utiliza un mecanismo mediante el cual se atrapan en la superficie de una membrana microorganismos cuyo

tamaño es mayor que el poro de membrana (0,45  $\mu\text{m}$ ), esto gracias a una bomba eléctrica que ejerce una presión de vacío diferencial sobre la muestra de agua (Vivanco, 2014, p. 16).

Las bacterias quedan en la superficie de la membrana y luego ésta es llevada a un medio enriquecido, selectivo o diferencial, entonces a través de un proceso de intercambio metabólico e incubación, se produce el crecimiento de microorganismos (UFC). Esta técnica es altamente reproducible y proporciona resultados cuantitativos, es una manera rápida y simple de estimar poblaciones bacterianas en agua y útil al momento de evaluar numerosas pruebas diarias (Vivanco, 2014, p. 16).

#### **4.8 Métodos Rápidos para la Enumeración de Microorganismos Indicadores**

Realizar análisis microbiológico tradicional es una tarea que consume gran cantidad de tiempo y trabajo, por ello se han desarrollado métodos rápidos, fáciles de utilizar, fáciles para cuantificar y detectar microorganismos, ya que en ocasiones es necesario dar resultados rápidos, que permitan tomar decisiones en periodos de tiempo corto, y no es posible, debido a que se debe esperar que los microorganismos crezcan en los medios de cultivo y lograr visualizar su presencia, su crecimiento es lento y a menudo los microorganismos de interés se encuentran en cantidades muy pequeñas con respecto a la flora microbiana restante, lo que implica un pre-enriquecimiento previo en medios selectivos, invirtiendo un mayor tiempo. Los métodos rápidos, por tanto; ofrecen la posibilidad de evitar algunos pasos de la técnica tradicional; es decir ayudan con, ahorro de tiempo y trabajo (Pérez, 2018, p. 23-24).

#### 4.8.1 Placas petrifilm

Las placas 3M Petrifilm™ constituyen unos de los múltiples sistemas que han sido diseñados para facilitar la realización del análisis microbiológico de los alimentos.

Constan de dos delgadas láminas con diversos componentes que reproducen (con gran proximidad) la situación de una placa convencional de medio de cultivo sólido. Al tratarse de placas ya preparadas (su uso no requiere más que la inoculación de la muestra, la incubación y la lectura) y muy finas, se facilitan tanto el transporte como la realización de las determinaciones y se ahorra espacio en las estufas de incubación. Por otra parte, las placas incluyen un fondo cuadrículado que facilita la ubicación de las colonias (Rodríguez, 2014, p. 17).

##### ***Placa Petrifilm™ para recuento de *E. coli* /coliformes***

La placa Petrifilm™ para recuento de *E. coli*/ coliformes está compuesta por una lámina de papel con una cuadrícula impresa recubierta de polipropileno conteniendo nutrientes del medio Bilis Glucosa con cristales de Violeta y Rojo neutro (VRBG), el indicador 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-glucorónido (BCIG) y un agente gelificantes soluble en agua fría (el área donde se desarrollan los microorganismos está definida por una película intermedia de espuma). Se complementa en la parte superior con otra lámina de polipropileno que contiene gel soluble en agua fría y tricloruro de trifenil tetrazolio como indicador (Infante, 2016, p. 37).

La mayoría de las *E. coli* (cerca del 97%) produce beta-glucoronidasa, la que a su vez produce un precipitado azul asociado con la colonia. La película superior atrapa el gas producido por la lactosa que fermentan *E. coli* y Coliformes. Cerca del 95% de *E. coli* produce gas, representado por colonias entre azules y rojo-azules asociadas a gas atrapado,

mientras que los Coliformes son colonias rojas asociadas con burbujas de gas. Éstas placas se incuban por 24 +/- 2 horas a 35°C para cuantificar Coliformes / *E. coli*, pero; para mayor precisión de *E. coli* se deja 48 +/- 2 horas a la misma temperatura (Santizo, 2017, p. 34).

#### **4.9 Fuentes de Contaminación del Agua**

A medida que el agua viaja a través de la superficie de la tierra o a través del suelo, disuelve minerales que se producen de manera natural y, en algunos casos, material radioactivo. Es posible que incorpore sustancias que surgen de la presencia de animales o de la actividad humana: contaminantes microbianos, tales como virus y bacterias, que pueden provenir de plantas de tratamiento de aguas residuales, sistemas sépticos, operaciones agrícolas y ganaderas, vida silvestre; contaminantes inorgánicos, como sales y metales, que pueden producirse de manera natural o ser el resultado de escurrimientos, las industrias o las descargas de aguas residuales domésticas, la producción de hidrocarburos, la minería o la agricultura; pesticidas y herbicidas, que provienen de una variedad de fuentes tales como agricultura, y usos residenciales; contaminantes químicos orgánicos incluidos los sintéticos y volátiles, que son subproductos de procesos industriales y producción de petróleo, y que también pueden provenir de estaciones de servicio, y sistemas sépticos; además de contaminantes radioactivos, lo que puede ocurrir de manera natural o ser el resultado de la producción de hidrocarburos o actividades mineras (Gilbert, 2016, p. 2-3).

#### **4.10 Agua Contaminada y su Efecto en la Salud**

El agua contaminada y el saneamiento deficiente están relacionados con la transmisión de enfermedades como el cólera, la disentería, la hepatitis A, la fiebre tifoidea y la

poliomielitis. Los servicios de agua y saneamiento inexistentes, insuficientes o gestionados de forma inapropiada exponen a la población a riesgos prevenibles para su salud (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2018, párr 7).

Se calcula que unas 842.000 personas mueren cada año de diarrea como consecuencia de la insalubridad del agua, de un saneamiento insuficiente o de una mala higiene de las manos (OMS, 2018, párr 8-9).

## **5. Materiales y Métodos**

### **5.1 Tipo de Estudio**

La presente investigación es de tipo descriptivo, y de corte transversal.

### **5.2 Área de Estudio**

Cinco marcas comerciales de agua embotellada sin gas expendidas en la ciudad de Loja seleccionadas mediante encuesta; siendo éstas las más consumidas por los estudiantes de la Facultad de la Salud Humana de la Universidad Nacional de Loja.

### **5.3 Universo y Muestra**

El universo estuvo conformado por todas las aguas embotelladas sin gas de las marcas seleccionadas con presentaciones de 500 y 750 mL; que presentaban Registro Sanitario, mismo lote, y fecha de expiración vigente en los dos muestreos y que se expendían en la ciudad de Loja. El primer muestreo se procesó del 8 de noviembre al 13 de diciembre y el segundo del 20 de diciembre al 26 de enero, tomándose dos lotes por marca durante el estudio.

Con la finalidad de reunir la mayor cantidad de datos posibles la muestra estuvo conformada por 20 botellas que presentaban las características mencionadas; ya que el muestreo que evalúa la conformidad del producto lo realiza únicamente el organismo certificador o acreditador aplicando la norma INEN 1077 vigente.

### **5.4 Codificación e Identificación de muestras**

Se analizó un total de 200 muestras, 40 por cada marca durante los dos muestreos, para facilitar su procesamiento fueron codificadas de la siguiente manera (Tabla 1).



Tabla 1

**Códigos asignados a las marcas analizadas**

<b>Marca</b>	<b>Tipo de Agua</b>	<b>Primer muestreo</b>	<b>Segundo muestreo</b>
Vivant	Agua Purificada Envasada	V	V'
Dasani	Agua Purificada Envasada sin Gas	D	D'
Pure Water	Agua Purificada Envasada	P	P'
Cielo	Agua Purificada Envasada sin Gas	C	C'
Manantial	Agua Purificada y Envasada sin Gas	M	M'

*Fuente:* Elaboración propia

*Autora:* Andrea Ivanova Angamarca Bautista

**5.5 Criterios de Inclusión y Exclusión****5.5.1 Criterios de inclusión.**

- Muestras de agua embotellada en presentaciones de 500 a 750 mL
- Muestras con Registro Sanitario, conservadas a temperatura ambiente, de un mismo lote.
- Muestras con envases íntegros y cierre hermético

**5.5.2 Criterios de exclusión.**

- Muestras que durante el transporte al laboratorio sufran alguna rotura en el envase
- Muestras que durante el procesamiento se vean afectadas por la rotura de la membrana filtrante utilizada para la misma.

## 5.6 Métodos, Técnicas y Procedimientos

### Fase pre-analítica

- Autorización para el procesamiento de muestras en el Laboratorio de Análisis Químico del Centro de Investigación la Universidad Nacional de Loja; por el director del Centro de Investigación de la Universidad Nacional de Loja Dr. Nikolay Aguirre (Anexo 1)
- Aplicación de encuesta para la selección de las marcas de agua que van hacer procesadas (Anexo 2)
- Protocolo de transporte de muestras según la norma (Anexo 3)

### Fase analítica

- Codificación, identificación y registro de muestras (Anexo 4)
- Determinación de Coliformes Totales y Fecales (*E. coli*) (Anexo 5)

### Fase post-analítica

- Registro de los resultados obtenidos (Anexo 6)
- Fórmula para el Recuento de Coliformes Totales/ *E. coli* (Anexo 7)

## 5.7 Tabulación y análisis de resultados

La tabulación de los resultados se expresa en tablas y porcentajes.

## 6. Resultados

### Determinación de Coliformes Totales

Tabla 2.

#### Determinación de Coliformes totales

Muestras de agua embotellada	Muestras que presentaron contaminación bacteriológica		UFC/250 mL		Porcentajes de muestras positivas a contaminación
	Primer muestreo	Segundo muestreo	Primer muestreo	Segundo muestreo	
V, V' = 40	V3, V5	V'7	3	1	7,5%
D, D' = 40	-	-	-	-	0%
P, P' = 40	-	-	-	-	0%
C, C' = 40	C12, C14	C'3, C'4	3	2	10%
M, M' = 40	-	-	-	-	0%

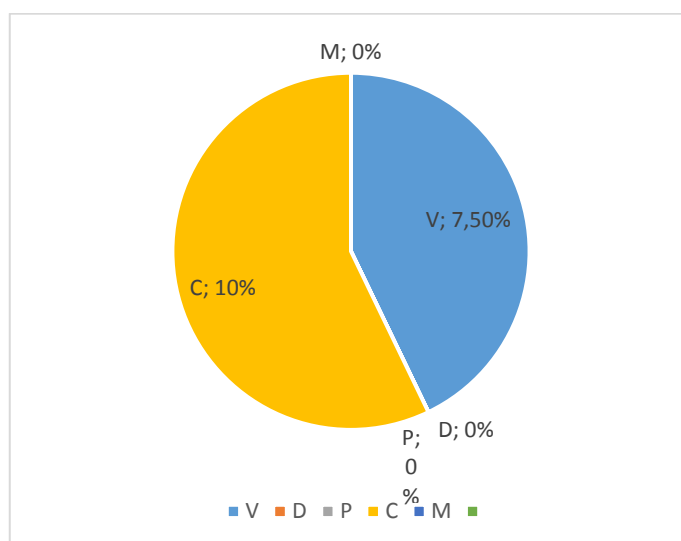
Clave: (-) no presenta contaminación

Fuente: Datos obtenidos en el laboratorio

Autora: Andrea Ivanova Angamarca Bautista

Gráfico 1.

#### Determinación de Coliformes totales



Fuente: Datos obtenidos en el laboratorio

Autora: Andrea Ivanova Angamarca Bautista

**Interpretación.** En la Tabla y Figura 2 se observa la presencia de contaminación por Coliformes totales en 2 marcas, 7,5% de muestras para la marca V y 10% de muestras para la marca C.

#### **Determinación de Coliformes fecales (*E. coli*)**

El total de muestras cumplieron con la normativa para *E. coli*, siendo 0 UFC/250 mL el límite de aceptación.

## Evaluación de la calidad bacteriológica de las marcas de agua analizadas

**Tabla 3**

***Ranking de calidad bacteriológica***

<b>Marcas de Agua</b>	<b>Porcentajes de Muestras Contaminadas</b>	<b>N° de Posición de Acuerdo al Cumplimiento de la Norma INEN 2200</b>
M	0%	<b>1</b>
D	0%	
P	0%	
V	7,5%	<b>2</b>
C	10%	<b>3</b>

**Fuente:** Elaboración propia

**Autora:** Andrea Ivanova Angamarca Bautista

**Interpretación.** La evaluación bacteriológica de las marcas analizadas se determinó con una especie de ranking, teniéndose en cuenta el cumplimiento de los parámetros establecidos por la norma INEN 2200 que indica, ausencia de Coliformes totales y *E. coli* como límite de aceptación. En tercera posición se ubica la marca C con un 10% de contaminación de las muestras, seguida por la marca V con un 7,5% de contaminación; en tanto que, las marcas M, D y P ocuparon el primer lugar.

## 7. Discusión

El estudio arrojó resultados esperados respecto a los rangos establecidos para *E. coli* por la Norma INEN 2200 que indica ausencia o no detectables como límite de aceptación; sin embargo, si se evidenció la presencia de Coliformes totales.

Realizando un análisis con estudios nacionales, se encontró similitudes, así como diferencias; por lo que se dan a conocer los mismos:

Arteaga (2017) en la investigación realizada en el cantón Riobamba, provincia de Chimborazo, demostró que de las 10 marcas de agua embotellada que se evaluaron, el 100% cumplía con los parámetros establecidos respecto a coliformes fecales y totales, tanto por el método del NMP como en la técnica 3M™ Petrifilm™ (Arteaga, 2016, p. 70-71); si bien en los dos estudios se utiliza la técnica de 3M™ Petrifilm™, el tamaño de muestra 40 por marca, pudo haber sido un factor favorable para obtener resultados mucho más reales; ya que, en el estudio antes mencionado se analizó 3 muestras por marca sin mencionar si pertenecen a un mismo lote.

Otro estudio realizado por Macías (2015) evaluó la calidad microbiológica de las aguas embotelladas comercializadas en la ciudad de Babahoyo provincia de Los Ríos, determinando que 3 de las 5 marcas estudiadas sobrepasan el indicador establecido para aerobios mesófilos considerándose no aptas para el consumo humano; con respecto a coliformes, las 5 marcas cumplieron la Norma INEN 2200 (Macías, 2015, p. 57). Aunque en éste estudio no se evidencia Coliformes totales, la presencia de aerobios mesófilos sobrepasa la normativa que indica 25 UFC/mL como límite de aceptación, lo que indica no aptas para su consumo.

Por otro lado, el estudio realizado por el Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC) en diciembre de 2016, muestra la contaminación de agua embotellada a escala nacional en un 28,6 % para *E. coli*; siendo la misma evaluada con un reactivo que determinaba de forma momentánea la presencia o ausencia de la bacteria *E. coli* (Alarcón, 2017, párr 1,6 y 8); si comparamos nuestro estudio con el ya mencionado, podemos observar gran diferencia en cuánto al método utilizado y al porcentaje de contaminación.

Villegas (2013) en el estudio realizado en aguas envasadas en funda a temperatura ambiente y refrigeración en el Cantón Shushufindi de la Provincia de Sucumbíos, demostró que de las 6 marcas analizadas en su totalidad excedían el límite de aerobios mesófilos, así mismo todas las marcas presentaron colonias de Coliformes totales (Villegas, 2013, p. 87-88); aunque éste estudio se realizó en aguas envasadas en funda; lo que hace posible un mayor riesgo de contaminación; se puede observar la similitud existente en cuánto a la presencia de Coliformes totales.

Tanto en el presente estudio como en algunos de los anteriormente citados, se puede evidenciar la presencia de microorganismos que afectan a la salud humana causando problemas gastrointestinales.

## 8. Conclusiones

Por lo evidenciado en el estudio, se puede concluir que:

- Existe presencia de Coliformes Totales en 7,5% de las muestras para la marca V y 10% de las muestras para la marca C; lo cual podría deberse a múltiples factores en el proceso de elaboración.
- La ausencia de *E. coli* en la totalidad de muestras, indica el cumplimiento de la normativa INEN 2200 que considera 0 UFC/250mL como límite de aceptación.
- La marca V y la marca C no cumplen con la normativa para Coliformes totales que considera microorganismo no detectable como límite de aceptación, en tanto que las marcas P, M y D sí lo hacen para los indicadores microbiológicos evaluados.



## 9. Recomendaciones

- Para evitar falsos positivos, validar el método a utilizarse con controles positivo y negativo.
- En la medida de lo posible tener un control negativo por muestra
- Llevar un registro de uso y mantenimiento de los equipos utilizados
- Se recomienda la evaluación e inspección sanitaria y vigilancia continua por parte de los organismos reguladores como el departamento de Agencia Nacional de Regulación Control y Vigilancia Sanitaria (ARCSA) cuya responsabilidad es extender los registros sanitarios y posteriormente evaluar si se ésta cumpliendo con la normativa de calidad.

## 10. Bibliografía

- Administración de medicamentos y alimentos [FDA]. (15 de Mayo de 2017). *USA. Food and Drug Administration*. Obtenido de USA. Food and Drug Administration: <http://bottled-water-food-and-drug-administration-fda>
- Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria. (16 de Mayo de 2017). *Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria [ARCSA]*. Obtenido de Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria: <http://www.controlsanitario.gob.ec/arcsa-realiza-control-en-embotelladoras-de-agua-en-quito/>
- Agua para la Salud. Pasado, Presente y Futuro. (2012). En V. y. Toxqui, *Agua para la Salud. Pasado, Presente y Futuro* (pág. 345). Madrid: CSIC.
- Alarcón, I. (17 de Mayo de 2017). El 70% de los ecuatorianos consume agua segura, según el INEC. *El Comercio*, pág. 1.
- American Public Health Association, A. W. (15 de Mayo de 2017). *Standar methods for the examination of water and wastewater*. Obtenido de Standar methods for the examination of water and wastewater: <https://www.standardmethods.org>
- Aneabe. (15 de Diciembre de 2016). *Las aguas de bebida envasadas*. Obtenido de Las aguas de bebida envasadas: <http://institutoaguaysalud.es/wp-content/uploads/2016/10/Libro-Blanco-de-las-aguas-ensadas.pdf>
- Arcos Pullido, M. d. (15 de Junio de 2010). *Indicadores microbiológicos de contaminación de las fuentes de agua*. Obtenido de Indicadores microbiológicos de contaminación

de las fuentes de agua.:

[http://www.unicolmayor.edu.co/invest\\_nova/NOVA/ARTREVIS2\\_4.pdf](http://www.unicolmayor.edu.co/invest_nova/NOVA/ARTREVIS2_4.pdf)

Arteaga, S. (17 de Agosto de 2016). *Estudio microbiológico de las aguas embotelladas que se expenden en la ciudad de Riobamba*. Obtenido de Estudio microbiológico de las aguas embotelladas que se expenden en la ciudad de Riobamba: [dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/5770/1/56T00663.pdf](http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/5770/1/56T00663.pdf)

Camarillo, M. (12 de Julio de 2015). *Agua embotellada, un negocio de moda, aunque 41% del producto sea de la llave*. Obtenido de Agua embotellada, un negocio de moda, aunque 41% del producto sea de la llave: <http://www.cronica.com.mx/notas/2015/908776.html>

Carbajal, Á. (7 de Febrero de 2014). *Manual de nutrición y dietética*. Obtenido de Manual de nutrición y dietética: <http://eprints.ucm.es/22755/1/Manual-nutricion-dietetica-CARBAJAL.pdf>

Carbajal, Á., & González, M. (16 de Mayo de 2012). Propiedades y funciones biológicas del agua. En V. y. Toxqui, *Agua para la salud pasado, presente y futuro* (págs. 33-45). Madrid: CSIC. Obtenido de Manual práctico de nutrición y salud. Conceptos generales:

[https://www.kelloggs.es/content/dam/newton/media/manual\\_de\\_nutricion\\_new/Manual\\_Nutricion\\_Kelloggs\\_Capitulo\\_02.3.pdf](https://www.kelloggs.es/content/dam/newton/media/manual_de_nutricion_new/Manual_Nutricion_Kelloggs_Capitulo_02.3.pdf)

Explored. (19 de Agosto de 2006). *En Ecuador circulan alrededor de 12 marcas de agua que no son aptas para el consumo humano*. Obtenido de En Ecuador circulan alrededor de 12 marcas de agua que no son aptas para el consumo humano: <http://hoy.tawsa.com/noticias-ecuador/piratas-venden-agua-del-grifo-243187.html>

Gilbert. (30 de Junio de 2016). *Informe sobre la calidad del agua*. Obtenido de Informe sobre la calidad del agua:

<https://www.gilbertaz.gov/home/showdocument?id=15402>

González, C., Gutierrez, C., & Grande, T. (20 de Mayo de 2012). *Flora bacteriana en agua mineral potable no carbonatada embotellada*. Obtenido de Flora bacteriana en agua mineral potable no carbonatada embotellada:

[https://www.researchgate.net/publication/19710688\\_Bacterial\\_flora\\_in\\_bottled\\_uncarbonated\\_mineral\\_drinking\\_water](https://www.researchgate.net/publication/19710688_Bacterial_flora_in_bottled_uncarbonated_mineral_drinking_water)

Huerta, L. (7 de Mayo de 2013). *Métodos para purificar el agua*. Obtenido de Métodos para purificar el agua:

[http://www.profeco.gob.mx/revista/publicaciones/adelantos\\_04/purificar\\_agua\\_mzo04.pdf](http://www.profeco.gob.mx/revista/publicaciones/adelantos_04/purificar_agua_mzo04.pdf)

Hunter P, e. a. (25 de Junio de 2010). *The bacteriological quality of bottled natural mineral waters*. Obtenido de The bacteriological quality of bottled natural mineral waters: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2249271&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Infante, C. ,. (5 de Enero de 2016). *Evaluacion de Tusa y Cáscara de Maíz como Sustrato para el Cultivo de Pleurotus pulmonarius*. Obtenido de Evaluacion de Tusa y Cáscara de Maíz como Sustrato para el Cultivo de Pleurotus pulmonarius: <file:///E:/Downloads/29520-83559-1-SM.pdf>

Macías, J. (6 de Febrero de 2015). *Evaluación de la calidad físico química y microbiológica de las aguas embotelladas, comercializadas en la ciudad de Babahoyo en el periodo enero-marzo 2013*. Obtenido de Evaluación de la calidad

físico química y microbiológica de las aguas embotelladas, comercializadas en la ciudad de Babahoyo en el periodo enero-marzo 2013:  
<http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/7042/1/MACIAS%20SANCHEZ%20JOSE%20EUSTAQUIO.pdf>

Marchand, O. (14 de Diciembre de 2011). *Microorganismos indicadores de la calidad de agua de consumo humano en Lima*. Obtenido de Microorganismos indicadores de la calidad de agua de consumo humano en Lima:  
[http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtual/tesis/basic/marchand\\_p\\_e/anteced.htm](http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtual/tesis/basic/marchand_p_e/anteced.htm)

Organización Mundial de la Salud [OMS]. (7 de Febrero de 2018). *Agua*. Obtenido de Agua: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs391/es/>

Organización Internacional de Normalización. (28 de mayo de 2008). Calidad del agua.

Orientaciones generales para el recuento de microorganismos en cultivo. Obtenido de ISO 8199:2005: <https://www.sis.se/api/document/preview/906191/>

Pepe, F. (1 de Diciembre de 2015). *Implementación de buenas prácticas de manufactura*. Obtenido de Implementación de buenas prácticas de manufactura:  
<http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/15894/1/AL%20594.pdf>

Pérez, R. (1 de Febrero de 2018). *Evaluación de condiciones higiénico sanitarias en el proceso de elaboración y envasado de alimentos en polvo con técnica de siembra rápida de microorganismos indicadores*. Obtenido de Evaluación de condiciones higiénico sanitarias en el proceso de elaboración y envasado de alimentos en polvo con técnica de siembra rápida de microorganismos indicadores:

<http://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/68361/TESIS%20ROCIO%20I.%20PEREZ%20PADILLA%20NOV.2017.pdf?sequence=1>

Plataforma de conocimiento sobre construcción ambientalmente sostenible de infraestructura en América latina y El Caribe [KPESIC]. (24 de Junio de 2016). *Manual de Agua Segura*. Obtenido de Manual de Agua Segura: [http://www.kpesic.com/sites/default/files/manual\\_de\\_agua\\_segura\\_0.pdf](http://www.kpesic.com/sites/default/files/manual_de_agua_segura_0.pdf)

Ramos Endara, J. A. (20 de Junio de 2011). *SPACE.PUCE.EDU.EC*. Obtenido de SPACE.PUCE.EDU.EC: <http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/4056/T-PUCE-3244.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Real academia española [RAE]. (2014). *Diccionario de la lengua española*. Madrid: Espasa Libros, S.L.U.

René, M., & Clara, M. (10 de Diciembre de 2010). *Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza*. Obtenido de Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza : A0202e. pdf

Ríos, S., Agudelo, R., & Gutierrez, L. (15 de Febrero de 2017). *Patógenos e indicadores microbiológicos de calidad del agua para consumo humano*. Obtenido de Patógenos e indicadores microbiológicos de calidad del agua para consumo humano: <http://aprendeenlinea.udea.edu.co/revistas/index.php/fnsp/article/view/26353/20784>  
405

Rodríguez, J. M. (19 de Marzo de 2014). *Guía de Prácticas de Higiene y Control Microbiológico en las Industrias Agroalimentarias*. Obtenido de Guía de Prácticas de Higiene y Control Microbiológico en las Industrias Agroalimentarias: [http://buleria.unileon.es/bitstream/handle/10612/3051/manual\\_practicas\\_Edicion2013.0.pdf](http://buleria.unileon.es/bitstream/handle/10612/3051/manual_practicas_Edicion2013.0.pdf)

Rosas Ronzón, I. Y. (01 de Diciembre de 2013). *Calidad microbiológica de aguas embotelladas de diferentes marcas en la ciudad de xalapa, ver.* Obtenido de calidad microbiológica de aguas embotelladas de diferentes marcas en la ciudad de xalapa, ver: <http://cdigital.uv.mx/bitstream/123456789/40203/1/rosasronzonirisyamileth.pdf>

Santizo, S. (7 de Diciembre de 2017). *Método práctico para la evaluación de la calidad microbiológica del agua para las aldeas del municipio de antigua Guatemala, Sacatepéquez, Guatemala*. Obtenido de Método práctico para la evaluación de la calidad microbiológica del agua para las aldeas del municipio de antigua Guatemala, Sacatepéquez, Guatemala: <http://recursosbiblio.url.edu.gt/tesiseortiz/2018/02/02/Santizo-Sergio.pdf>

Servicio Ecuatoriano de Normalización [INEN]. (11 de Abril de 2017). *NTE INEN 2200-2. Agua purificada envasada. Requisitos*. Obtenido de nte inen 2200-2. Agua purificada envasada. Requisitos: [http://apps.normalizacion.gob.ec/filesserver/2017/nte\\_inen\\_2200-2.pdf](http://apps.normalizacion.gob.ec/filesserver/2017/nte_inen_2200-2.pdf)

Servicio Ecuatoriano de Normalización. (07 de enero de 2014). *NTE INEN-ISO 9308-1. Calidad del agua. Detección y recuento de Escherichia coli y de bacterias*

*Coliformes. Parte 1: Método de filtración de Membrana.* Obtenido de nte inen-iso 9308-1.

Villegas, V. (20 de Mayo de 2013). *Análisis físico-químico y microbiológico de aguas envasadas en funda consumidas masivamente en el Cantón Shushufindi, Provincia Sucumbíos variando las condiciones de almacenamiento.* Obtenido de Análisis físico-químico y microbiológico de aguas envasadas en funda consumidas masivamente en el Cantón Shushufindi, Provincia Sucumbíos variando las condiciones de almacenamiento: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/1893/1/T-UCE-0008-25.pdf>

Vivanco, D. (14 de Febrero de 2014). *Validación de los métodos microbiológicos de filtración por membrana para la determinación de: coliformes fecales, coliformes totales, Escherichia coli y Pseudomona aeruginosa en la matriz de agua potable, natural y residual de los Laboratorios UTPL.* Obtenido de Validación de los métodos microbiológicos de filtración por membrana para la determinación de: coliformes fecales, coliformes totales, Escherichia coli y Pseudomona aeruginosa en la matriz de agua potable, natural y residual de los Laboratorios UTPL.



## 11. Anexos

### Anexo 1.- Autorización para el Procesamiento de Muestras

Loja, 26 de Octubre del 2017

Dr. Nikolay Aguirre Mendoza

**DIRECTOR DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA**

De mis consideraciones:

Yo, **Andrea Ivanova Angamarca Bautista** con **C.I 1104133721** estudiante del VIII Ciclo de la Carrera de Laboratorio Clínico de la Facultad de Salud Humana de la Universidad Nacional de Loja, solicito de la manera más comedida se digne autorizar la realización de mi proyecto titulado: **ESTUDIO BACTERIOLÓGICO DE CINCO MARCAS DE AGUA EMBOTELLADA SIN GAS, EXPENDIDAS EN LA CIUDAD DE LOJA**, para el desarrollo del mismo requiero realizar el procesamiento de las muestras en el Laboratorio de Microbiología del Centro de Análisis Químico de la Universidad Nacional de Loja.

Esperando ser atendida favorablemente, le antelo mi más sincero agradecimiento.

Muy atentamente,



Andrea Ivanova Angamarca Bautista

**Solicitante**

*N. Aguirre*  
**VTO. BUENO**  
 Dirección de Investigación UNL  
 Fecha: 26.10.2017

U. N. L. DIRECCION GENERAL DE INVESTIGACIONES  
 RECIBIDO POR .....  
 HORA ..... 17:45 .....  
 FECHA ..... 26 OCT 2017 .....

## Anexo 2.- Encuesta Aplicada para la Selección de las Marcas de Agua



**ENCUESTA**  
**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA**  
**FACULTAD DE LA SALUD HUMANA**  
**CARRERA DE LABORATORIO CLINICO**

La presente encuesta sobre el consumo de agua embotellada se la realiza con el fin de interpretar, cuáles son las principales marcas de agua consumidas por los estudiantes de la Facultad de la Salud Humana; necesaria para el tema de Tesis: “ESTUDIO BACTERIOLÓGICO DE 5 MARCAS DE AGUA EMBOTELLADA SIN GAS, EXPENDIDAS EN LA CIUDAD DE LOJA”.

### 1. DATOS INFORMATIVOS

Carrera: Enfermería

Edad: 20

### 2. INSTRUCCIONES

De la manera más comedida solicito a usted se digne contestar esta encuesta, señalando con una X la opción que considere apropiada.

1. ¿Consume usted agua embotellada?

Sí

No

2. ¿Cuál es la presentación de agua embotellada que consume con mayor frecuencia?

1/2 Litro

1 Litro

3. De las marcas de agua embotellada que se encuentran en el mercado. Indique en orden de preferencia las que usted consume; siendo el número más alto el de menor preferencia y el número más bajo el de mayor preferencia.

All Natural

4 Vivant

3 Dasani

5 Manantial

7 Cielo

6 Pure Water

2 Las Rocas

Otra, especifique

Ninguna

4. ¿En qué lugar adquiere su agua embotellada?

Tiendas locales

Supermercados

5. ¿Con qué frecuencia toma agua embotellada? De ser a diario, especifique las veces que la consume.

Una vez a la semana.

GRACIAS POR SU COLABORACIÓN

### **Anexo 3.- Protocolo de Transporte de Muestra**

1. Enviar las muestras al laboratorio en su envase original
2. Colocar las botellas de agua en recipientes isotérmicos, para preservar la integridad del envase
3. Mantener el recipiente o caja cerrado hasta llegar al laboratorio, para evitar la exposición a la luz solar.

Fuente: **NTE INEN 1529-2:99** Control microbiológico de los alimentos toma, envío y preparación de muestras para el análisis microbiológico. Páginas 10-11

**Anexo 4.- Codificación, identificación y registro de muestras**

<b>Marca comercial (Código)</b>	<b>Registro sanitario</b>	<b>Identificación del lote</b>	<b>Fecha de Elab/ Exp</b>	<b>Contenido Neto</b>	<b>Método de purificación</b>	<b>Identificación de muestras</b>
V	13534-ALN-0217	4L (11-10-17)	F. Elab: 11/10/17 F. Exp: 11/03/18	500 mL	Ósmosis Inversa	V1, ..... , V20
		4L (10-01-18)	F. Elab: 10/01/18 F. Exp: 10/06/18			V'1, ..... , V'20
D	3303-LH-1214	L4QN	F. Elab: 15/10/17 F. Exp: 12/02/18	600 mL	Ósmosis Inversa y Ozono	D1, ..... , D20
		LGGY	F. Elab: 26/12/17 F. Exp: 22/04/18			D'1 , ..... , D'20
P	06208-INHQAN-0106	LMI3	F. Elab: 10/ 11/17 F. Exp: 10/02/18	625 mL	Filtración y Ósmosis Inversa	P1, ..... P20
		LC1	F. Elab: 14/12/17 F. Exp: 14/03/18			P'1, ..... P'20

**Clave:** (.....) significa que la identificación de la muestra sigue la numeración en orden secuencial

**Fuente** Datos obtenidos en la recolección

**Autora:** Andrea Ivanova Angamarca Bautista

<b>Marca comercial (Código)</b>	<b>Registro sanitario</b>	<b>Identificación del lote</b>	<b>Fecha de Elab/ Exp</b>	<b>Contenido Neto</b>	<b>Método de Purificación</b>	<b>Identificación de muestras</b>
C	2078-INHG-AM-1203	L14Nov2017	F. Elab: 14/11/17 F. Exp: 14/04/18	625mL	Filtración, Rayos Ultravioleta y Ozono	C1, ..... , C20
		L13Ene2018	F. Elab: 13/01/18 F. Exp: 13/06/18			C'1, ..... , C'20
M	0002-BPM-AN-0814	3B1329	F. Elab: 8/11/17 F. Exp: 6/03/18	500 mL	Microfiltración y Ozono	M1 , ..... , M20
		3B0028	F. Elab: 5/01/18 F. Exp: 12/05/18			M'1 , ..... , M'20

**Fuente:** Datos obtenidos en la recolección  
**Autora:** Andrea Ivanova Angamarca Bautista

## Anexo 5.- Determinación de Coliformes Totales y Fecales (*E. coli*)

### Filtración por membrana

La técnica utiliza un mecanismo mediante el cual se atrapan en la superficie de una membrana microorganismos cuyo tamaño es mayor que el poro de la membrana, esto gracias a una bomba que ejerce vacío diferencial sobre la muestra de agua.

### Equipo de filtración

Consiste en un soporte metálico (manifold) con colectores múltiples de filtración, manipulados por llaves de paso conectadas a un sistema de vacío, dichos colectores presentan un soporte de goma o caucho que sostienen el portafiltro, sobre el cuál se coloca la membrana de filtración y el embudo, entre el portafiltro y el embudo una pinza o abrazadera mantiene su fijación.

El equipo de filtración del estudio estuvo conformado por un manifold marca Nalgene®, embudos marca Millipore con abrazaderas y una bomba de vacío.



**Fig. 1** Equipo de filtración

### Membranas de filtración

Discos de papel compuestos por ésteres de celulosa, con diámetro de 47 mm y porosidad de 0,45 $\mu$ m e impreso de una cuadrícula con tinta que no afecta el crecimiento bacteriano.

Las membranas utilizadas en el estudio fueron marca Merck Millipore, N° de lote F7BA47736 ya que cumplen con los requerimientos del análisis; presentan ésteres de celulosa mixta, 0.45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro para una retención completa y recuperación máxima de coliformes totales y bacterias coliformes fecales, estériles y con tinta utilizada no tóxica y libre de inhibidores bacterianos para la cuadrícula.



**Fig. 2.** Membrana de celulosa

### **Medio de cultivo para Coliformes totales y fecales (*E. coli*)**

#### ***Placas 3M™ Petrifilm™ para recuento de E. coli/ Coliformes***

Medios de cultivo certificados y listos para usarse, compuestos por una lámina de papel con una cuadrícula impresa recubierta de polipropileno conteniendo nutrientes del medio Bilis Glucosa con cristales de Violeta y Rojo neutro (VRBG), el indicador 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-glucorónido (BCIG) y un agente gelificantes soluble en agua fría. Se complementa en la parte superior con otra lámina de polipropileno que contiene gel soluble en agua fría y tricloruro de trifenil tetrazolio como indicador.

La mayoría de las *E. coli* (cerca del 97%) produce beta-glucoronidasa, la que a su vez produce un precipitado azul asociado con la colonia. La película superior atrapa el gas producido por la lactosa que fermentan *E. coli* y Coliformes. Cerca del 95% de *E. coli*



produce gas, representado por colonias azules asociadas a gas atrapado, mientras que los Coliformes son colonias rojas. Se incuban por 24 +/- 2 horas a 35 +/- 2°C para cuantificar Coliformes, para *E. coli* se deja 48 +/- 2 horas a la misma temperatura.

Las placas 3M™ Petrifilm™ son certificadas por la Asociación de científicos en métodos analíticos, las que se utilizaron en el estudio pertenecen a la marca 3M, en presentación de 25 unidades, presentan temperatura de almacenamiento de 8°C, y un tiempo de utilidad una vez abiertas 30 días.



**Fig. 3.** Paquete de placas 3M™ Petrifilm™ para *E. coli*/Coliformes

### **Control de calidad del medio de cultivo**

Es considerado como punto crítico de control ya que del mismo depende la seguridad y confiabilidad de los resultados.

Para el estudio se consideró un control negativo; para ello se filtró el mismo volumen que las muestras, de agua destilada estéril; transcurrido el tiempo y temperatura de incubación no existió crecimiento bacteriano.

### **Materiales y equipos**

- membranas filtrantes
- pinzas con bordes redondeados

- pipeta automática de 1.000 uL y puntas desechables
- matraz kitazato para recolectar la muestra filtrada
- equipo de filtración conformado por bomba de vacío, portafiltros, embudos y abrazadera
- incubadora

## **Esterilización del área de trabajo y material**

### *Área de trabajo*

Utilizar una cámara de flujo laminar, limpiar antes de usar y poner 10 minutos los ultravioletas, apagarlos y encender el flujo de aire.

Durante el estudio se utilizaron 4 mecheros de alcohol para crear una zona aséptica de trabajo, ya que por la dimensión del equipo no se pudo utilizar la cámara de bioseguridad; en este caso se tomó todas las precauciones para evitar la contaminación de las muestras por microorganismos ambientales.

### *Aparatos del equipo*

Con la excepción del material que se suministra estéril, los aparatos y material de vidrio deben esterilizarse conforme a uno de los siguientes métodos: a) en una estufa a (170 +/- 10) °C durante 1h como mínimo, b) en autoclave a (121+/-3) °C durante 20 min

Hervir agua destilada en un vaso de precipitado y sumergir el portafiltros para mantener la esterilización del mismo.

Para la esterilización del material se siguió las recomendaciones citadas, con la diferencia que para esterilizar el portafiltros se lo sumergió en agua ultrapura.

### ***Materiales***

Utilizar pinzas estériles con bordes redondeados para la manipulación de los filtros de membrana, lograr este cometido sumergiendo las pinzas en alcohol y flameándolas.

### **Procedimiento del análisis**

#### ***Preparación de las placas 3M Petrifilm***

1. Colocar las placas en la mesa de trabajo e hidratar con 1 mL de agua destilada asegurándose que no queden burbujas atrapadas.
2. Dejar reposar la placa aproximadamente 3 minutos para que se solidifique el gel.
3. Llevar a refrigeración (6°C) por el lapso de una hora.

#### ***Preparación previa a la técnica***

1. Trabajar el análisis haciendo uso de las normas de bioseguridad (bata, gorro, mascarilla y guantes)
2. Desinfectar la mesa de trabajo con alcohol al 70 % y flamear la superficie de la misma para reforzar la zona de esterilidad.
3. Hacer uso de un matraz Kitasato para recolectar el volumen de muestra filtrada, incorporarlo a la bomba de vacío por el extremo de extracción.

#### ***Técnica de filtración por membrana***

1. Conectar el aparato de filtración a un sistema de vacío y verificar que las llaves de paso estén cerradas.
2. Colocar los portafiltros sobre la base del manifold.
3. Con pinza estéril colocar un filtro de celulosa con la cuadrícula hacia arriba en el disco poroso de la base de los filtros.

4. Colocar el embudo estéril en la base del filtro teniendo cuidado de no lesionar la membrana y logrando que quede centrada, fijarlos con las pinzas o abrazaderas que trae el equipo.
5. Mezclar bien la muestra mediante agitación vigorosa y verter en el embudo 250 mL.
6. Cubrir el embudo con papel aluminio, para evitar la entrada de partículas contaminantes.
7. Abrir las llaves del manifold y dejar filtrar.
8. Cerrar las llaves de paso tan pronto la muestra se haya filtrado.
9. Parar el sistema de vacío y retirar, pinzas y embudo.
10. Tomar las membranas con pinza estéril y colocarlas sobre la placa Petrifilm.
11. Colocar las placas en la incubadora en posición horizontal con la superficie transparente hacia arriba a 35 °C.
12. Realizar la lectura después de 24 +/- 2 horas para detectar Coliformes, hacerlo después de 48 +/- 2horas para *E. coli*.
13. Expresar los resultados en UFC /250 mL

Fuente: **NTE INEN-ISO 9308-1: 2014**, Calidad del agua. Detección y recuento de *escherichia coli* y de bacterias coliformes. Parte 1: método de filtración en membrana.

Página 8-10

**ISO 8199:2005** Calidad del agua: Guía general para el recuento de microorganismos sobre medio de cultivo. Página 11-15

**Anexo 6.- Registro de Resultados****Primer muestreo**

Identificación de la Muestra	Recuento de Coliformes Totales (UFC/250 ml)	Recuento de <i>E. Coli</i> (UFC/250 ml)
V1	0	0
V2	0	0
V3	1	0
V4	0	0
V5	2	0
V6	0	0
V7	0	0
V8	0	0
V9	0	0
V10	0	0
V11	0	0
V12	0	0
V13	0	0
V14	0	0
V15	0	0
V16	0	0
V17	0	0
V18	0	0
V19	0	0

Identificación de la Muestra	Recuento de Coliformes Totales (UFC/250 ml)	Recuento de <i>E. Coli</i> (UFC/250 ml)
V20	0	0
D1	0	0
D2	0	0
D3	0	0
D4	0	0
D5	0	0
D6	0	0
D7	0	0
D8	0	0
D9	0	0
D10	0	0
D11	0	0
D12	0	0
D13	0	0
D14	0	0
D15	0	0
D16	0	0
D17	0	0
D18	0	0
D19	0	0
D20	0	0

Identificación de la Muestra	Recuento de Coliformes Totales (UFC/250 ml)	Recuento de <i>E. Coli</i> (UFC/250 ml)
P1	0	0
P2	0	0
P3	0	0
P4	0	0
P5	0	0
P6	0	0
P7	0	0
P8	0	0
P9	0	0
P10	0	0
P11	0	0
P12	0	0
P13	0	0
P14	0	0
P15	0	0
P16	0	0
P17	0	0
P18	0	0
P19	0	0
P20	0	0
C1	0	0

Identificación de la Muestra	Recuento de Coliformes Totales (UFC/250 ml)	Recuento de <i>E. Coli</i> (UFC/250 ml)
C2	0	0
C3	0	0
C4	0	0
C5	0	0
C6	0	0
C7	0	0
C8	0	0
C9	0	0
C10	0	0
C11	0	0
C12	2	0
C13	0	0
C14	1	0
C15	0	0
C16	0	0
C17	0	0
C18	0	0
C19	0	0
C20	0	0
M1	0	0
M2	0	0



Identificación de la Muestra	Recuento de Coliformes Totales (UFC/250 ml)	Recuento de <i>E. Coli</i> (UFC/250 ml)
M3	0	0
M4	0	0
M5	0	0
M6	0	0
M7	0	0
M8	0	0
M9	0	0
M10	0	0
M11	0	0
M12	0	0
M13	0	0
M14	0	0
M15	0	0
M16	0	0
M17	0	0
M18	0	0
M19	0	0
M20	0	0

**Segundo muestreo**

Identificación de la Muestra	Recuento de Coliformes Totales (UFC/250 ml)	Recuento de <i>E. Coli</i> (UFC/250 ml)
V'1	0	0
V'2	0	0
V'3	0	0
V'4	0	0
V'5	0	0
V'6	0	0
V'7	1	0
V'8	0	0
V'9	0	0
V'10	0	0
V'11	0	0
V'12	0	0
V'13	0	0
V'14	0	0
V'15	0	0
V'16	0	0
V'17	2	0
V'18	0	0
V'19	0	0
V'20	0	0

Identificación de la Muestra	Recuento de Coliformes Totales (UFC/250 ml)	Recuento de <i>E. Coli</i> (UFC/250 ml)
D'1	0	0
D'2	0	0
D'3	0	0
D'4	0	0
D'5	0	0
D'6	0	0
D'7	0	0
D'8	0	0
D'9	0	0
D'10	0	0
D'11	0	0
D'12	0	0
D'13	0	0
D'14	0	0
D'15	0	0
D'16	0	0
D'17	0	0
D'18	0	0
D'19	0	0
D'20	0	0
P'1	0	0

Identificación de la Muestra	Recuento de Coliformes Totales (UFC/250 ml)	Recuento de <i>E. Coli</i> (UFC/250 ml)
P'2	0	0
P'3	0	0
P'4	0	0
P'5	0	0
P'6	0	0
P'7	0	0
P'8	0	0
P'9	0	0
P'10	0	0
P'11	0	0
P'12	0	0
P'13	0	0
P'14	0	0
P'15	0	0
P'16	0	0
P'17	0	0
P'18	0	0
P'19	0	0
P'20	0	0
C'1	0	0
C'2	0	0

Identificación de la Muestra	Recuento de Coliformes Totales (UFC/250 ml)	Recuento de <i>E. Coli</i> (UFC/250 ml)
C'3	1	0
C'4	1	0
C'5	0	0
C'6	0	0
C'7	0	0
C'8	0	0
C'9	0	0
C'10	0	0
C'11	0	0
C'12	0	0
C'13	0	0
C'14	0	0
C'15	0	0
C'16	0	0
C'17	0	0
C'18	0	0
C'19	0	0
C'20	0	0
M'1	0	0
M'2	0	0
M'3	0	0

Identificación de la Muestra	Recuento de Coliformes Totales (UFC/250 ml)	Recuento de <i>E. Coli</i> (UFC/250 ml)
M'4	0	0
M'5	0	0
M'6	0	0
M'7	0	0
M'8	0	0
M'9	0	0
M'10	0	0
M'11	0	0
M'12	0	0
M'13	0	0
M'14	0	0
M'15	0	0
M'16	0	0
M'17	0	0
M'18	0	0
M'19	0	0
M'20	0	0

## Anexo 7.- Calculo de Resultados

### Placas de la muestra que contienen menos de 10 colonias

Los recuentos desde 20 hasta el límite superior (práctico) de cada método se encuentran en el rango de precisión óptimo. La precisión es todavía aceptable para recuentos entre 10 y 20. La precisión disminuye rápidamente a medida que el número de colonias disminuye, dependiendo del propósito de la prueba, se puede definir un límite inferior de determinación en un conteo inferior de 10

De acuerdo con ISO / TR 13843, la definición de límite de determinación es la “partícula media más baja” concentración  $x$  por porción analítica donde la incertidumbre estándar relativa esperada es igual a un valor especificado (RSD) “. RSD es la desviación estándar relativa, que se calcula dividiendo la estimación de la desviación estándar  $s$  de una población de una muestra por la media  $x$  de esa muestra. En lugar de RSD, el símbolo  $w$  se usa para la desviación estándar relativa. Por lo tanto,  $w = s / x$  .

En el caso de una distribución de Poisson,  $x$  se calcula mediante la ecuación (4):

$$X = 1 / w^2$$

Si  $w$  se establece en 0,50 (50%) como el límite de precisión relativa aceptable (que parece ser razonable en microbiología), el límite inferior de determinación estará en el número de colonia dado por

$$X = 1 / 0,50^2 = 4$$

Por lo tanto, los resultados basados en conteos de menos de cuatro deben ser tratados como una mera detección de la presencia del organismo.

Si todas las placas contienen menos de 10 colonias, pero el número total de colonias en todas las placas es 4 o más, el resultado se calcula como caso general (número estimado); es decir aplicando fórmulas.

**Si el total es de 1 a 3 colonias, la precisión del resultado es tan baja que es aconsejable informar el resultado como organismo presente en el volumen estudiado.**

Fuente: **ISO 8199:2005** Calidad del agua: Guía general para el recuento de microorganismos sobre medio de cultivo. Página 19



**Anexo 8.- Certificación de Haber Realizado el Procesamiento de Muestras en el  
Laboratorio de Análisis Químico del Centro de Investigación de la UNL**



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA  
DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN**


*Nikolay Aguirre, Ph.D.*  
**DIRECTOR DE INVESTIGACIÓN  
DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA**


**CERTIFICA:**

Que la **Srta. Andrea Ivanova Angamarca Bautista**, estudiante de la carrera de Laboratorio Clínico, realizó el muestreo de la Tesis denominada: **Estudio Bacteriológico de cinco marcas de agua embotelladas sin gas, expeditas en la ciudad de Loja**, durante los meses de noviembre y diciembre de 2017 y enero de 2018, actividades cumplidas en el laboratorio de Análisis Químico.

Lo certifico en honor a la verdad.

Loja, 28 de marzo de 2018

  
*Nikolay Aguirre, Ph.D.*  
**DIRECTOR DE INVESTIGACIÓN UNL**



**Anexo 9.-Norma INEN-ISO 9308-1: 2014**

Quito – Ecuador

**NORMA  
TÉCNICA  
ECUATORIANA**

**NTE INEN-ISO 9308-1**  
Primera edición  
2014-01

**CALIDAD DEL AGUA. DETECCIÓN Y RECUENTO DE ESCHERICHIA COLI Y DE BACTERIAS COLIFORMES. PARTE 1: MÉTODO DE FILTRACIÓN EN MEMBRANA (ISO 9308-1:2000, IDT)**

WATER QUALITY. DETECTION AND ENUMERATION OF ESCHERICHIA COLI AND COLIFORM BACTERIA PART 1: MEMBRANE FILTRATION METHOD (ISO 9308-1:2000, IDT)

---

Correspondencia:

Esta Norma Técnica Ecuatoriana es una traducción idéntica de la Norma Internacional ISO 9308-1:2000.

DESCRIPTORES: Calidad agua, detección, recuento, bacterias, filtración, membrana.  
ICS: 13.060.30

25 Páginas
---------------

## ÍNDICE

	Página
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>6</b>
<b>1 OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN.....</b>	<b>6</b>
<b>2 NORMAS PARA CONSULTA .....</b>	<b>6</b>
<b>3 TÉRMINOS Y DEFINICIONES .....</b>	<b>7</b>
<b>4 FUNDAMENTO.....</b>	<b>7</b>
<b>5 APARATOS Y MATERIAL DE VIDRIO .....</b>	<b>8</b>
<b>6 MEDIO DE CULTIVO Y DILUYENTE.....</b>	<b>8</b>
<b>7 MUESTREO .....</b>	<b>9</b>
<b>8 PROCEDIMIENTO.....</b>	<b>9</b>
<b>9 EXPRESIÓN DE RESULTADOS .....</b>	<b>10</b>
<b>10 INFORME DE ENSAYO.....</b>	<b>10</b>
<b>11 ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD .....</b>	<b>10</b>
<b>ANEXO A (Informativo) INFORMACIÓN MICROBIOLÓGICA COMPLEMENTARIA SOBRE LAS BACTERIAS COLIFORMES .....</b>	<b>11</b>
<b>ANEXO B (Normativo) MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS.....</b>	<b>12</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>15</b>

## INTRODUCCIÓN

La presencia y el nivel de contaminación fecal constituye un factor importante en la evaluación de la calidad de una masa de agua y del riesgo de infección que representa para la salud humana. El análisis de muestras de agua para detectar la presencia de *Escherichia coli*, que normalmente habita en el tracto intestinal de hombres y otros animales de sangre caliente, proporciona una indicación de este tipo de contaminación. Los resultados del análisis de bacterias coliformes pueden resultar más difíciles de interpretar dado que algunas bacterias coliformes viven en el suelo y en las aguas dulces superficiales y, por tanto, no tienen siempre un origen intestinal. La presencia de bacterias coliformes, aunque no pruebe de forma concluyente una contaminación de origen fecal, sí puede indicar fallos en el tratamiento o en la distribución del agua. La identificación de las cepas aisladas puede permitir en ocasiones obtener información acerca de su origen.

## 1 OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN

Esta parte de la Norma ISO 9308 especifica un método de referencia (ensayo estándar) para la detección y recuento de *Escherichia coli* y bacterias coliformes en agua destinada al consumo humano. El método estándar se basa en la filtración en membrana, el posterior cultivo en un medio de agar de diferenciación y el cálculo del número de los organismos objeto de ensayo en la muestra.

El método estándar es poco selectivo y permite la detección de bacterias dañadas. Debido a esta baja selectividad, el crecimiento de la flora bacteriana general puede afectar a la fiabilidad del recuento de *E. coli* y bacterias coliformes, por ejemplo, en algunas aguas potables, tales como las aguas de pozos poco profundos, que no han sido desinfectadas y que dan lugar a importantes crecimientos de flora interferente. Esta parte de la Norma ISO 9308 es, por tanto, especialmente adecuada para agua desinfectada y otras aguas potables con bajas densidades bacterianas.

Esta parte de la Norma ISO 9308 incluye un método rápido (ensayo rápido) para la detección, en menos de 24 h, de *E. coli* en aguas destinadas al consumo humano, y que puede resultar muy útil en aquellos casos en los que se requiere una rápida información. El ensayo rápido se basa en la filtración en membrana, el posterior cultivo, en condiciones selectivas, y el cálculo del número de *E. coli* en la muestra.

Los ensayos estándar y rápido descritos en esta parte de la Norma ISO 9308 son aplicables a otros tipos de aguas, siempre que la materia en suspensión o la flora de fondo no interfieran en la filtración, el cultivo y el recuento.

## 2 NORMAS PARA CONSULTA

Las normas que a continuación se relacionan contienen disposiciones válidas para esta norma internacional. En el momento de la publicación las ediciones indicadas estaban en vigor. Toda norma está sujeta a revisión por lo que las partes que basen sus acuerdos en esta norma internacional deben estudiar la posibilidad de aplicar la edición más reciente de las normas indicadas a continuación. Los miembros de CEI y de ISO poseen el registro de las normas internacionales en vigor en cada momento.

ISO/CEI – Guía 2. *Normalización y actividades relacionadas. Vocabulario general.*

ISO 3696:1987 – *Agua para uso en análisis de laboratorio. Especificación y métodos de ensayo.*

ISO 5667-1:1980 – *Calidad del agua. Muestreo. Parte 1: Guía para el diseño de los programas de muestreo.*

ISO 5667-2: 1991 – *Calidad del agua. Muestreo. Parte 2: Guía para las técnicas de muestreo.*

ISO 5667-3:1994 – *Calidad del agua. Muestreo. Parte 3: Guía para la conservación y manipulación de las muestras.*

ISO 6887-1:1999 – *Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Preparación de las muestras de ensayo, suspensión inicial y diluciones decimales para examen microbiológico. Parte 1: Reglas generales para la preparación de la suspensión inicial y las diluciones decimales.*

ISO 8199:1988 – *Calidad del agua. Guía general para el recuento de microorganismos sobre medio de cultivo.*

### 3 TÉRMINOS Y DEFINICIONES

En lo que concierne a esta parte de la Norma ISO 9308, se aplican los términos y definiciones dados en la Guía ISO/CEI 2 así como las definiciones siguientes.

**3.1 bacterias lactosa-positivas:** (Ensayo estándar) bacterias capaces de formar colonias en condiciones aerobias a  $(36 \pm 3)^\circ\text{C}$  en un medio de cultivo de lactosa selectivo y diferencial, con producción de ácido en  $(21 \pm 3)$  h.

**3.2 bacterias coliformes:** (Ensayo estándar) bacterias lactosa-positivas según la definición indicada en el apartado 3.1 y que son oxidasa-negativas.

**3.3 *Escherichia coli*:** (Ensayo estándar) bacterias coliformes según la definición indicada en el apartado 3.2 y que, además, producen indol a partir de triptófano en  $(21 \pm 3)$  h a  $(44,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ .

**3.4 *Escherichia coli*:** (Ensayo rápido) bacterias resistentes a la bilis y que, además, producen indol a partir de triptófano en  $(21 \pm 3)$  h a  $(44,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ .

### 4 FUNDAMENTO

#### 4.1 Descripción general del método

Este método está basado en la filtración en membrana y comprende dos partes, el ensayo estándar de referencia y el ensayo rápido opcional, que pueden llevarse a cabo en paralelo tal y como se describe a continuación. El ensayo estándar consiste en la incubación de la membrana en un medio selectivo seguida de una caracterización bioquímica de las colonias típicas lactosa-positivas, lo que conduce a la detección y recuento de las bacterias coliformes y *E. coli* en un período de 2 a 3 días. El ensayo rápido consiste en dos etapas de incubación que permiten la detección y el recuento de *E. coli* en  $(21 \pm 3)$  h. Si se efectúan los dos ensayos, el ensayo rápido y el ensayo estándar, en paralelo, el resultado final de *E. coli* debe ser el más elevado de ambos.

#### 4.2 Filtración e incubación

Se filtran porciones de ensayo a través de membranas que retienen las bacterias. Se coloca una membrana (ensayo estándar) en un medio de cultivo selectivo de agar lactosado y se incuba a  $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$  durante  $(21 \pm 3)$  h, mientras que otra membrana (ensayo rápido) se coloca en un medio de cultivo de agar que contiene caseína (digestato triptico), se incuba a  $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$  durante 4 h a 5 h, y, a continuación, a  $(44 \pm 0,5)^\circ\text{C}$  durante un período de 19 h a 20 h en un medio de cultivo de agar que contiene caseína (digestato triptico) y sales biliares.

#### 4.3 Evaluación y confirmación, ensayo estándar

Se efectúa el recuento de las colonias características presentes en la membrana como bacterias lactosa-positivas. Para la identificación de las bacterias coliformes y *E. coli*, se procede a una resiembra de colonias características, elegidas de forma aleatoria, para la realización de ensayos de confirmación: oxidasa y producción de indol. Se calcula el número de bacterias coliformes lactosa-positivas y de *E. coli* susceptibles de estar presentes en 100 ml de muestra.

#### 4.4 Evaluación y confirmación, ensayo rápido

Se cuentan como *E. coli* las colonias presentes en la membrana que son capaces de producir indol, a partir del triptófano añadido en el medio de agar. Se calcula el número de *E. coli* susceptibles de estar presentes en 100 ml de muestra.

## 5 APARATOS Y MATERIAL DE VIDRIO

Material de uso habitual en laboratorios microbiológicos y, en particular, el siguiente:

### 5.1 Aparato para esterilización por vapor (autoclave)

Con la excepción del material que se suministra estéril, los aparatos y el material de vidrio deben esterilizarse conforme a las instrucciones dadas en la Norma ISO 8199.

### 5.2 Baño de agua y/o incubadora, con control termostático a $(36 \pm 2)$ °C.

### 5.3 Baño de agua y/o incubadora, con control termostático a $(44,0 \pm 0,5)$ °C.

NOTA – Para el ensayo rápido, es posible reemplazar las incubadoras 5.2 y 5.3 por una incubadora programable con doble ajuste:  $(36 \pm 2)$  °C y  $(44,0 \pm 0,5)$  °C.

### 5.4 pH-metro, con una precisión de $\pm 0,1$ .

### 5.5 Dispositivo para la filtración en membrana, conforme a la Norma ISO 8199.

5.6 **Filtros de membrana**, compuestos por ésteres de celulosa, generalmente de 47 mm o de 50 mm de diámetro, con características de filtración equivalentes a una porosidad nominal de 0,45  $\mu\text{m}$  y preferiblemente con una cuadrícula impresa.

Los filtros deben estar exentos de propiedades susceptibles de inhibir o favorecer el crecimiento bacteriano, y la tinta de impresión utilizada para la cuadrícula no debe afectar al crecimiento de las bacterias. Si no se suministran estériles, se debe proceder a su esterilización de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Debería controlarse la aptitud de cada lote de filtros para el ensayo conforme a la Norma ISO 7704, teniendo en cuenta especialmente que la utilización de diferentes marcas de filtros puede implicar una diferencia en el desarrollo del color.

NOTA – Los filtros de membrana verdes pueden ser útiles cuando se emplea el ensayo rápido debido a que facilita una mejor detección del desarrollo del color.

### 5.7 Pinzas con bordes redondeados, para la manipulación de los filtros de membrana.

### 5.8 Lámpara ultravioleta, de una longitud de onda de 254 nm (lámpara de mercurio de baja presión).

**ADVERTENCIA – La luz ultravioleta puede causar irritación de los ojos y de la piel. Deben utilizarse gafas y guantes protectores.**

### 5.9 Discos de papel de filtro, con un diámetro de al menos 47 mm.

## 6 MEDIO DE CULTIVO Y DILUYENTE

Para la preparación de los medios de cultivo y los reactivos se utilizan constituyentes de calidad uniforme y productos químicos de calidad analítica reconocida (véase nota); síganse las instrucciones incluidas en el anexo B. También pueden utilizarse medios de cultivo y reactivos disponibles comercialmente siempre que se ajusten a las composiciones indicadas en el anexo B y se sigan estrictamente las instrucciones del fabricante.

NOTA – Pueden utilizarse productos químicos de otras calidades, siempre que se demuestre que tienen un funcionamiento equivalente en el ensayo.

Para la preparación de los medios de cultivo, se utiliza agua destilada en un equipo de vidrio o desmineralizada, exenta de sustancias capaces de inhibir el crecimiento bacteriano en las condiciones del ensayo y que sea conforme a la Norma ISO 3696.

Salvo que se especifique lo contrario, los medios preparados son estables durante al menos un mes, siempre que se conserven en la oscuridad, a una temperatura de  $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$  y protegidos contra la evaporación.

## 7 MUESTREO

Se toman las muestras y se transportan hasta el laboratorio conforme a lo indicado en las Normas ISO 5667-1, ISO 5677-2 e ISO 5667-3.

## 8 PROCEDIMIENTO

### 8.1 Preparación de la muestra

Para la preparación de la muestra, la filtración y la siembra sobre los medios de aislamiento, deben seguirse las instrucciones dadas en las Normas ISO 8199 e ISO 6887-1. Es preferible iniciar el examen de las muestras inmediatamente después de su toma. Si las muestras se conservan a temperatura ambiente (en la oscuridad, sin sobrepasar los  $25 ^\circ\text{C}$ ), su análisis debe comenzar antes de que hayan transcurrido 6 h desde el momento de la toma de muestras. En circunstancias excepcionales, las muestras pueden conservarse a una temperatura de  $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$  durante un período máximo de 24 h antes de su análisis.

### 8.2 Filtración

Se filtran 100 ml (o volúmenes superiores, por ejemplo 250 ml, en caso de aguas embotelladas) de la muestra a estudiar utilizando un filtro de membrana (5.6). Se coloca el filtro en el medio de agar respectivo (véanse los apartados 8.3 y 8.4), asegurándose de que no quedan burbujas de aire atrapadas por debajo.

### 8.3 Incubación y diferenciación, ensayo estándar

Después de la filtración (8.2), se coloca la membrana en la placa que contiene el agar lactosado con TTC (B.1) y se incuba a  $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$  durante  $(21 \pm 3)$  h.

NOTA 1 – La ampliación del tiempo de incubación a  $(44 \pm 4)$  h puede aumentar la sensibilidad del ensayo y resulta especialmente útil en aquellos casos en los que las placas no presentan las colonias características después de transcurridas  $(21 \pm 3)$  h.

NOTA 2 – El empleo de un filtro de membrana adicional para la incubación a  $44 ^\circ\text{C}$  puede evitar los problemas causados por el crecimiento de la flora bacteriana interferente.

Se examina la membrana y se recuentan como bacterias lactosa-positivas todas las colonias características, sin tomar en consideración el tamaño, que presentan un desarrollo de color amarillo del medio bajo la membrana. Para los ensayos de oxidasa e indol, se resiembran preferiblemente todas las colonias características obtenidas, o un número representativo de ellas (diez como mínimo), sobre agar no selectivo (B.3) y en caldo de cultivo de triptófano, respectivamente.

Se incuba el agar no selectivo  $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$  durante  $(21 \pm 2)$  h y se lleva a cabo el ensayo de la oxidasa, tal y como se indica a continuación.

- Se depositan sobre un papel de filtro dos o tres gotas de reactivo de oxidasa (B.5.1) de preparación reciente.
- Se deposita una parte de la colonia en el papel de filtro utilizando una varilla de vidrio o de madera o bien un asa de platino o de plástico (no de níquel-cromo).
- La reacción se considera positiva si se desarrolla un color azul/violeta oscuro en 30 s.

Se incuba el tubo de caldo de cultivo de triptófano (B.2) a  $(44,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$  durante  $(21 \pm 3)$  h y se comprueba la producción de indol añadiendo de 0,2 ml a 0,3 ml de reactivo de Kovacs (B.5.1). La aparición de una coloración roja en la superficie del caldo confirma la producción de indol.

Se realiza un recuento de todas las colonias que dan una reacción oxidasa negativa y se consideran como **bacterias coliformes**.

Se realiza un recuento de todas las colonias que presentan reacción oxidasa negativa y dan reacción indol positiva y se consideran como *E. coli*.

NOTA 3 – En casos especiales, puede ser necesaria la identificación de las bacterias coliformes, por ejemplo, para distinguir entre cepas de origen fecal y aquellas de origen acuático o telúrico.

#### 8.4 Incubación y diferenciación, ensayo rápido

Después de la filtración (8.2), se coloca la membrana sobre el medio TSA (B.3) y se incuba a  $(36 \pm 2)$  °C durante un período de 4 h a 5 h. A continuación, se coloca la membrana sobre el medio TBA (B.4) y se incuba a  $(44 \pm 0,5)$  °C durante un período de 19 h a 20 h.

Si así se desea, los dos medios de agar pueden combinarse en una misma placa Petri de doble capa (véase el capítulo B.4). En este caso, es conveniente colocar la membrana sobre una placa recientemente preparada con una doble capa consistente en TSA (B.3) y TBA (B.4) e incubar a  $(36 \pm 2)$  °C durante un período de 4 h a 5 h y, a continuación, incubar a  $(44 \pm 0,5)$  °C durante un período de 19 h a 20 h.

Tras la incubación, se coloca la membrana en un disco de papel de filtro (5.9) saturado con reactivo de indol (B.5.2) y se irradia con una lámpara ultravioleta (5.8) durante un tiempo de 10 min a 30 min, dependiendo del desarrollo del color (véase la nota 1). Se cuentan todas las colonias de color rojo en la membrana y se consideran como *E. coli*.

NOTA 1 – Los reactivos de base acuosa disponibles comercialmente pueden permitir la obtención de resultados más rápidos y más claros, sin necesidad de la irradiación UV.

NOTA 2 – La distribución irregular de las colonias o la presencia de una gran cantidad de flora de fondo puede interferir en la diferenciación de las colonias indol positivas a causa de la difusión del color a las colonias adyacentes.

## 9 EXPRESIÓN DE RESULTADOS

A partir del recuento del número de colonias características presentes en la membrana (8.3) y teniendo en cuenta los resultados de los ensayos de confirmación efectuados, se calcula el número de *E. coli*, de bacterias coliformes y, si fuera necesario, de bacterias lactosa positivas presentes en 100 ml de muestra, conforme a la Norma ISO 8199. En el caso en que ambos métodos (ensayo estándar y ensayo rápido) se hayan utilizado en paralelo, tal y como se ha descrito, el resultado final para *E. coli* es el más alto de los dos obtenidos.

## 10 INFORME DE ENSAYO

El informe de ensayo debe contener como mínimo la siguiente información.

- a) una referencia a esta parte de la Norma ISO 9308;
- b) todos los detalles necesarios para la completa identificación de la muestra;
- c) los resultados expresados conforme a lo indicado anteriormente en el capítulo 9;
- d) cualquier hecho especial observado en el curso del análisis y cualquier operación no especificada en el método o considerada como optativa, que pudiera haber modificado los resultados.

## 11 ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

El laboratorio debe poseer un sistema de control de la calidad claramente definido para garantizar que los materiales, los reactivos y las técnicas son apropiados para el ensayo.



ANEXO A (Informativo)

**INFORMACIÓN MICROBIOLÓGICA COMPLEMENTARIA SOBRE LAS BACTERIAS COLIFORMES**

Las bacterias coliformes son bacterias Gram negativas, no formadoras de esporas, oxidasa negativas y con forma de bastoncillo, que pueden crecer en medio aerobio y anaerobio facultativo en presencia de sales biliares (u otros agentes de superficie con propiedades inhibitorias del crecimiento similares), y que, normalmente, son capaces de fermentar lactosa con producción de ácido y aldehído en 48 h cuando se incuban a una temperatura de  $(36 \pm 2)$  °C. Las bacterias coliformes poseen la enzima  $\beta$ -galactosidasa.

Las bacterias *E. coli* son bacterias coliformes capaces de producir indol a partir de triptófano, en  $(21 \pm 3)$  h a  $(44,0 \pm 0,5)$  °C. También poseen la enzima  $\beta$ -galactosidasa, reaccionan positivamente en el ensayo del rojo de metilo y pueden decarboxilar el ácido L-glutámico, pero no son capaces de producir acetil metil carbinol, de utilizar citrato como única fuente de carbono o de crecer en un caldo de cultivo con cianuro de potasio (KCN).

## ANEXO B (Normativo)

## MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

**B.1 Agar de lactosa TTC con heptadecilsulfato de sodio****B.1.1 Medio de base**

Lactosa	20 g
Peptona	10 g
Extracto de levadura	6 g
Extracto de carne	5 g
Azul de bromotimol	0,05 g
Agar-agar (en polvo o en escamas)	15 g a 25 g <sup>1)</sup>
Agua destilada	1 000 ml

Se disuelven los ingredientes en el agua por calentamiento. Si fuera necesario, se ajusta el pH de modo que, tras la esterilización, tenga un valor de  $7,2 \pm 0,1$  a 25 °C. Se reparte el medio en matraces, en volúmenes que no excedan los 250 ml, y se esteriliza en autoclave a  $(121 \pm 3)$  °C durante 15 min.

**B.1.2 Solución TTC**

Cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio	0,05 g
Agua destilada	100 ml

Se disuelve el TTC en un pequeño volumen de agua y se enrasa a 100 ml. Se esteriliza por filtración en membrana de 0,2 µm de tamaño de poro nominal.

**B.1.3 Solución de heptadecilsulfato de sodio**

Heptadecilsulfato de sodio (Tergitol <sup>2)</sup> 7)	0,2 g
Agua destilada	100 ml

Se disuelve el heptadecilsulfato de sodio en un pequeño volumen de agua y se enrasa a 100 ml. Se esteriliza en autoclave a  $(121 \pm 3)$  °C durante 15 min.

**B.1.4 Medio completo**

Medio de base (B.1.1)	100 ml
Solución de TTC (B.1.2)	5 ml
Solución de heptadecilsulfato de sodio (B.1.3)	5 ml

1) Según el poder gelificante del agar-agar.

2) Tergitol 7 es un ejemplo de producto apropiado disponible comercialmente. Esta información se da a título informativo para los usuarios de la presente parte de la Norma ISO 9308 y no significa en absoluto que ISO apruebe o recomiende de forma exclusiva el empleo de este producto.

Se funde el medio de base y se enfría a  $(50 \pm 5)$  °C. Se añaden de forma aséptica las soluciones de TTC y de heptadecilsulfato de sodio, se mezcla completamente evitando la formación de burbujas después de cada adición. Se reparte en las placas de doble capa formando una capa de al menos 5 mm de espesor. Si no van a utilizarse de forma inmediata, la conservación debe realizarse en oscuridad a  $(5 \pm 3)$  °C durante un período no superior a los 10 d.

### B.2 Caldo de cultivo de triptófano

Digestato triptico de caseína	10 g
L-Triptófano	1 g
Cloruro de sodio	5 g
Agua destilada	1 000 ml

Se disuelven los ingredientes en agua por calentamiento. Se reparten 3 ml en cada tubo de ensayo. Se cierran los tubos con algodón o con tapones de plástico o metal. Se introducen en el autoclave a  $(121 \pm 3)$  °C durante 15 min. Es conveniente que el pH del medio una vez listo para su empleo sea de  $7,5 \pm 0,1$  a 25 °C.

NOTA – No es necesario añadir L-triptófano en caso de que el contenido de triptófano presente en el digestato triptico de caseína utilizado sea suficiente. En su lugar, se añaden otros 10 g adicionales de digestato triptico de caseína.

### B.3 Agar triptonado de soja (TSA)

Digestato triptico de caseína	15 g
Peptona de soja	5 g
Cloruro de sodio	5 g
Agar-agar (en polvo o en escamas)	15 g a 25 g <sup>1)</sup>
Agua destilada hasta	1 000 ml

Se disuelven los ingredientes en el agua por calentamiento. Si fuera necesario, se ajusta el pH de modo que, tras la esterilización, tenga un valor de  $7,2 \pm 0,1$  a 25 °C. Se reparte el medio en los matraces o los tubos, en volúmenes que no excedan los 250 ml, y se esteriliza en autoclave a  $(121 \pm 3)$  °C durante 15 min. Se deja enfriar el medio hasta  $(50 \pm 5)$  °C y se reparte en placas de doble capa, formando una capa de espesor no inferior a 5 mm.

NOTA – Para el ensayo de oxidasa, también puede emplearse, en lugar del TSA, cualquier medio agar no selectivo que no interfiera con el ensayo de oxidasa (con un bajo contenido de carbohidratos fermentables).

### B.4 Agar triptonado de sales biliares (TBA)

Triptona	20 g
Sales biliares	1,5 g
Agar-agar (en polvo o en escamas)	15 g a 25 g <sup>1)</sup>
Agua destilada	1 000 ml

Se disuelven los ingredientes en el agua por ebullición. Si fuera necesario, se ajusta el pH de modo que, tras la esterilización, tenga un valor de  $7,2 \pm 0,1$  a 25 °C. Se reparte el medio en los matraces o los tubos, en volúmenes que no excedan los 250 ml, y se esteriliza en autoclave a  $(121 \pm 3)$  °C durante 15 min. Se deja enfriar el medio hasta  $(50 \pm 5)$  °C y se reparte en placas de doble capa, formando una capa de espesor no inferior a 5 mm.

Se preparan placas Petri de doble capa vertiendo TSA (B.3) fundido a  $(50 \pm 5)$  °C sobre la placa de TBA (B.4) templada hasta temperatura ambiente.

Debe utilizarse una cantidad de TSA que origine una capa de aproximadamente 1 mm de espesor (por ejemplo, 2,5 ml para una placa de doble capa de 55 mm de diámetro). Se deja solidificar y se seca, si fuera necesario, colocando la placa en posición invertida en una incubadora a  $(36 \pm 2)$  °C.

Las placas de doble capa deben prepararse inmediatamente antes de cada análisis (de 30 min a 60 min antes de colocar las membranas sobre las placas de agar).

## B.5 Reactivos

### B.5.1 Reactivo de Kovacs para el ensayo del indol, ensayo estándar

<i>p</i> -dimetilaminobenzaldehído	5 g
alcohol amílico o butílico (exento de bases orgánicas)	75 ml
Ácido clorhídrico ( $\rho = 1,18$ g/ml)	25 ml

Se disuelve el aldehído en el alcohol. Se añade el ácido concentrado cuidadosamente. Debe protegerse de la luz y conservarse a  $(5 \pm 3)$  °C.

NOTA – Es conveniente que la coloración del reactivo se encuentre entre el amarillo claro y el marrón claro; algunas muestras de alcohol amílico no dan resultados adecuados y toman un color oscuro al mezclarse con el aldehído.

**ADVERTENCIA – Las operaciones de preparación del reactivo deben realizarse bajo una campana extractora de gases. Deben utilizarse guantes de protección y evitar cualquier contacto con la piel al manipular el *p*-dimetilaminobenzaldehído. El alcohol amílico puede irritar las membranas mucosas y provocar mareos.**

### B.5.2 Reactivo de indol, ensayo rápido

<i>p</i> -dimetilaminobenzaldehído	0,5 g
Ácido clorhídrico, $c(\text{HCl}) = 1$ mol/l	100 ml

Se disuelve el *p*-dimetilaminobenzaldehído en el ácido clorhídrico (véase la advertencia en el apartado B.5.1).

El reactivo se conserva en un recipiente no translúcido a  $(5 \pm 3)$  °C. El reactivo debería presentar una coloración amarilla clara y no debe utilizarse si el color cambia a marrón amarillento.

### B.5.3 Reactivo de la oxidasa

Hidrocloreuro de tetrametil- <i>p</i> -fenilendiamina	0,1 g
Agua destilada	10 ml

Este reactivo no es estable y debe prepararse cada vez que vaya a utilizarse.

**ADVERTENCIA – El tetrametil-*p*-fenilendiamina es cancerígeno. Las operaciones de preparación del reactivo deben realizarse bajo una campana extractora de gases. Deben utilizarse guantes de protección y evitar cualquier contacto con la piel.**

**BIBLIOGRAFÍA**

- [1] BARRELL, R.A.E. (1992). A Comparison Between Tryptone Bile Agar and Membrane Lauryl Sulphate Broth for the Enumeration of Presumptive *Escherichia coli* in Water. *Water Res.* **26**: 677-681.
- [2] HAVELAAR, A.H. y DURING, M. (1988). Evaluation of the Anderson Baird-Parker Direct Plating Method for Enumerating *Escherichia coli* in Water. *J Appl. Bacteriol.* **64**: 89-98.
- [3] SCHETS, F.M. y HAVELAAR, A.H. (1991). Comparison of Indole Production and  $\beta$ -Glucuronidase Activity for the Detection of *Escherichia coli* in a Membrane Filtration Method. *Lett. Appl. Microbiol.* **13**: 272-274.
- [4] SCHETS, F.M., MEDEMA, G.J. y HAVELAAR, A.H. (1993). Comparison of Colilert with Dutch Standard Enumeration for *Escherichia coli* and Total Coliforms in Water. *Lett. Appl. Microbiol.* **17**: 17-19.

## ANEXO ZA (Normativo)

**OTRAS NORMAS INTERNACIONALES CITADAS EN ESTA NORMA  
CON LAS REFERENCIAS DE LAS NORMAS EUROPEAS CORRESPONDIENTES**

Esta norma europea incorpora disposiciones de otras normas por su referencia, con o sin fecha. Estas referencias normativas se citan en los lugares apropiados del texto de la norma y se relacionan a continuación. Las revisiones o modificaciones posteriores de cualquiera de las normas referenciadas con fecha, sólo se aplican a esta norma europea cuando se incorporan mediante revisión o modificación. Para las referencias sin fecha se aplica la última edición de esta norma (incluyendo sus modificaciones).

NOTA – En el caso que una publicación internacional sea modificada por modificaciones comunes, indicada por (mod), se aplica la EN/HD correspondiente.

<b>Norma Internacional</b>	<b>Fecha</b>	<b>Título</b>	<b>EN</b>	<b>Fecha</b>
ISO 3696	1987	Agua para uso en análisis de laboratorio. Especificación y métodos de ensayo.	EN ISO 3696	1995
ISO 5667-1	1980	Calidad del agua. Muestreo. Parte 1: Guía para el diseño de los programas de muestreo.	EN 25667-1	1993
ISO 5667-2	1991	Calidad del agua. Muestreo. Parte 2: Guía para las técnicas de muestreo.	EN 25667-2	1993
ISO 5667-3	1994	Calidad del agua. Muestreo. Parte 3: Guía para la conservación y manipulación de las muestras.	EN ISO 5667-3	1995
ISO 6887-1	1999	Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Preparación de las muestras de ensayo, suspensión inicial y diluciones decimales para examen microbiológico. Parte 1: Reglas generales para la preparación de la suspensión inicial y las diluciones decimales.		

## Anexo 10.- Certificación de traducción del resumen



Líderes en la Enseñanza del Inglés

Prof. Carlos Velastegui  
DOCENTE DE FINE-TUNED ENGLISH CÍA. LTDA.

### CERTIFICA:

Que el documento aquí compuesto es fiel traducción del idioma español al idioma inglés, del Resumen de Tesis titulada: "ESTUDIO BACTERIOLÓGICO DE CINCO MARCAS DE AGUA EMBOTELLADA SIN GAS, EXPEDIDAS EN LA CIUDAD DE LOJA", autoría de la Señorita Andrea Ivanova Angamarca Bautista, con número de cédula 1104133721, egresada en la Carrera de Laboratorio Clínico, de la Universidad Nacional de Loja.

Lo certifica en honor a la verdad y autoriza a la interesada, hacer uso del presente en lo que a sus intereses convenga.

Loja, 06 de julio de 2018

Prof. Carlos Velastegui  
DOCENTE DE FINE-TUNED ENGLISH CÍA. LTDA.



*Líderes en la Enseñanza del Inglés*