



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
CÁTEDRA COMPONENTE DE LA INVESTIGACIÓN

**CALIDAD SANITARIA DE LAS AGUAS MINERALES
ENVASADAS SABORIZADAS EXPENDIDAS EN UN
AUTOMERCADO DEL MUNICIPIO LIBERTADOR DEL ESTADO
MÉRIDA**

Autoras:

García Peraza Ana Eloisa
Vargas Otalvarez Estefany Shirley del Carmen

Tutora:

Prof. MSc. María Gabriela Gutiérrez

Mérida, noviembre de 2017



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
CÁTEDRA COMPONENTE DE LA INVESTIGACIÓN



**CALIDAD SANITARIA DE LAS AGUAS MINERALES
ENVASADAS SABORIZADAS EXPENDIDAS EN UN
AUTOMERCADO DEL MUNICIPIO LIBERTADOR DEL ESTADO
MÉRIDA**

Trabajo especial de grado presentado como requisito parcial para optar al título de
Licenciadas en Bioanálisis

Autoras:

García Peraza Ana Eloisa
Vargas Otalvarez Estefany Shirley del Carmen

Tutora:

Prof. MSc. María Gabriela Gutiérrez

Mérida, noviembre de 2017

DEDICATORIA

A Dios por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

A mis padres Juan y Rosa, por haberme apoyado en todo momento, por su motivación y su ejemplo de constancia y perseverancia, siempre están allí para mí con su amor infinito. Todo este trabajo ha sido posible gracias a ellos. Los AMO.

A mis hermanos Jesús y Raul, por su apoyo incondicional y ayuda. Los quiero mucho.

A mi hermana Yajaira, por siempre estar conmigo, brindándome su apoyo y ayuda, muchas veces cumpliendo mi rol de madre. Gracias por tu ayuda hermana. T.Q.M

A mis hijos Matias y Juan Andrés, por ser mi fuente de inspiración y motivación, una vez más mis hijos trajeron sentido a mi vida, son ellos la causa de mi felicidad, mis ganas de progresar y seguir siempre adelante, agradezco a Dios por darme tan hermosa compañía. Los AMO.

A mi amiga y compañera de tesis Shirley, más que mi mejor amiga eres como una hermana porque desde que nos conocimos hemos estado juntas en los momentos buenos y malos. Gracias por ayudarme y apoyarme en todo momento. T.Q.M

A Albert, por darme fuerza y apoyo en los momentos más duro durante mi carrera.

Ana Eloisa García Peraza

DEDICATORIA

A Dios por darme la oportunidad de vivir, por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante mi carrera. Sin Él nada hubiese sido posible.

A mis Padres Simón y Alix, por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo y su ejemplo de constancia y perseverancia para alcanzar esta meta, gracias porque siempre están allí para mí con su amor infinito. Este triunfo es para ustedes. Los Amo.

A mis Hermanos Sirlanix y Roger de ustedes he aprendido que hay aciertos y desaciertos pero siempre hay una razón para sonreír y ustedes son una para mí. Los Amo Hermanitos de mi vida.

A mis sobrinos Sebastián y Darlyannix su ternura y amor llenaban mis días de alegría y me impulsaba a ser mejor. Los amo, Dios los Bendiga.

A mi Nonita Estefania que siempre estuvo allí para mí con su amor sin límites me enseñó que todo en la vida es posible. Te Amo.

A mis Nonitos Silverio y Alejandrina y Tío Gilberto mis Ángeles, que desde el cielo me daban su bendición día tras día.

A Jonathan, tu apoyo ha sido fundamental en este caminar, siempre con una sonrisa y una palabra de aliento animándome a no rendirme y ahora me acompañas lleno de felicidad. Te Amo.

A mi Amiga y compañera de tesis Eloisa, eres la hermana que Dios me dio para que me acompañara lejos de casa, hoy nuestro sueño se hace realidad.

A mis Amigas Mayra, María de los Ángeles, Mariana y Milagros, gracias por estar allí siempre para mí siendo luz en el camino. Las quiero.

Estefany Shirley Vargas Otalvarez

AGRADECIMIENTO

Principalmente damos gracias a **Dios** por haber sido tan bondadoso con nosotras, por darnos fuerza y fe para creer en lo que parecía imposible de terminar.

A nuestra Ilustre **Universidad de Los Andes**, especialmente a la **Facultad de Farmacia y Bioanálisis** por abrirnos las puertas de su seno científico para poder formarnos como profesionales en lo que tanto nos apasiona.

A nuestra tutora **MSc. María Gabriela Gutiérrez** por brindarnos la oportunidad de recurrir a su capacidad y conocimientos científicos, por su paciencia al solucionarnos todas las dudas que surgieron en este largo camino, por tanta entrega y dedicación. Dios le Bendiga.

A la **Ingeniero Sulay Araque** del Laboratorio de preparación de medios de cultivo de la Escuela de Farmacia por su confianza, colaboración y por proporcionarnos todos los recursos necesarios para la culminación de nuestro estudio. Dios le pague.

A nuestros profesores que con esmero y cariño dieron lo mejor de sí para formar profesionales de calidad especialmente al **Dr. Pedro Matheus** por sus consejos y regaños muy oportunos cuando el camino se volvía gris. Gracias Profe.

A nuestros compañeros ya que con ellos vivimos los buenos y malos momentos que sólo se viven en la Universidad y que con algunos más que compañeros fuimos verdaderos amigos.

Ana García y Estefany Vargas

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	<i>iii</i>
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE GENERAL	vi
ÍNDICE DE TABLAS	X
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE GRAFICOS	xii
RESUMEN	<i>xiii</i>
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I. EL PROBLEMA	4
Planteamiento del Problema	4
Justificación de la Investigación	10
Objetivos de la Investigación	13
Objetivo General	13
Objetivos Específicos	13
Alcances y Limitaciones de la Investigación	14
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	15
Trabajos Previos	15
Antecedentes Históricos	19
BASES TEÓRICAS	22
Microbiología	22
Microbiología de las aguas	22
Calidad sanitaria de las aguas	23
Indicadores de calidad sanitaria en aguas	24
Coliformes	24

Coliformes Totales	24
Coliformes Fecales	25
Bacterias Aerobias Mesófilas (BAM)	26
Mohos y Levaduras	27
Patógenos	29
Características de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30
<i>Staphylococcus aureus</i>	32
Agua embotellada	33
Agua mineral natural	36
Características microbiológicas de las aguas minerales	37
Aguas minerales envasadas	38
Bebidas refrescantes modernas	40
Agua mineral saborizada	42
Características del agua saborizada	43
Materias primas del agua saborizada	43
Sabor artificial o natural	44
Azúcares y Edulcorantes	44
Aromas y colorantes	45
Dióxido de carbono	46
Reguladores de Acidez	46
Conservantes	47
Otros ingredientes	47
Parámetros microbiológicos para agua saborizada	49
Deterioro microbiano	49
Envases	50
Parámetros fisicoquímicos	51
Sabor y olor	51
Temperatura	52
pH	53
Método de la Membrana Filtrante	53

Equipo de filtracion	54
Ventajas del uso del método de la membrana filtrante	55
Limitaciones del uso del método de la membrana filtrante	56
Preparación y conservación de las muestras	56
Definición Operacional de términos	57
Agua mineral natural	57
Calidad sanitaria	57
Cepa	57
Coliformes	57
Colonia	57
Levadura	58
Moho	58
Potabilización	58
Operacionalización del evento de estudio	59
Hipótesis	60
CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO	61
Tipo de investigación	61
Diseño de la investigación	61
Población y muestra	62
Ubicación geográfica de la zona a estudiar.	62
Población	63
Selección del tamaño de la muestra	63
Recolección de las muestras	63
Procedimientos de la investigación	65
Materiales	65
Medios de cultivo comerciales deshidratados	66
Metodología	66
Procesamiento de las muestras de agua saborizada	66
Determinación de indicadores de calidad sanitaria	68
Recuento de Bacterias Aeróbicas Mesófilas	68

Recuento de coliformes totales y fecales	68
Recuento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	69
Recuento de mohos y levaduras	69
Determinación de Parámetros Fisicoquímicos	70
Determinación de pH	70
Determinación de Temperatura	70
Diseño de análisis	71
Diseño experimental	72
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	73
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	87
CONCLUSIONES	87
RECOMENDACIONES	88
BIBLIOHEMEROGRAFÍA	89
ANEXOS	107

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Pág.
1	Clasificación del agua potable envasada	39
2	Tipos de refrescos	41
3	Acción química de las materias primas en aguas saborizadas embotelladas	48
4	Operacionalización del Evento de Estudio	59
5	Identificación de las muestras seleccionadas para el estudio	63
6	Materiales utilizados para el procesamiento de las muestras y obtención de resultados	65
7	Cuantificación del número de Bacterias Aerobias Mesófilas en las muestras de agua mineral saborizada analizadas	74
8	Cuantificación del número de Coliformes Totales y Coliformes Fecales en las muestras de agua mineral saborizada analizadas	77
9	Cuantificación de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en las muestras de agua mineral saborizada analizadas	80
10	Determinación de Mohos y Levaduras en las muestras de agua mineral saborizada analizadas	82
11	Determinación de pH y Temperatura en las muestras de agua mineral saborizada analizadas	85

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Pág.
1	Crecimiento de bacterias coliformes totales en agar EMB	24
2	Crecimiento de coliformes fecales en agar bilis rojo violeta glucosa	25
3	Crecimiento de Bacterias Aerobias Mesófilas en agar Plate Count	26
4	Crecimiento de Mohos y Levaduras agar Saboraud	27
5	Crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en agar cetrimida	31
6	Crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> en agar Baird Parker	32
7	Diferentes presentaciones de agua embotellada	33
8	Proceso de producción de agua embotellada	35
9	Proceso de formación del agua mineral natural	37
10	Diferentes clases de aguas saborizada	42
11	Membranas de filtración millipore	54
12	Equipo de filtración utilizado para el procesamiento de las muestras	55
13	Mapa del municipio Libertador del estado Mérida	62
14	Muestras recolectadas	64

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico		Pág.
1	Distribución de crecimiento bacteriano en las muestras de agua mineral saborizadas analizadas	83

www.bdigital.ula.ve



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS



CÁTEDRA COMPONENTE DE LA INVESTIGACIÓN

CALIDAD SANITARIA DE LAS AGUAS MINERALES ENVASADAS SABORIZADAS EXPENDIDAS EN UN AUTOMERCADO DEL MUNICIPIO LIBERTADOR DEL ESTADO MÉRIDA

Autoras: García Peraza Ana Eloisa

Vargas Otalvarez Estefany Shirley

Tutora: Prof. MSc. María Gabriela Gutiérrez

RESUMEN

En Venezuela, en los últimos años se ha incrementado el consumo de agua mineral envasada saborizada. Se trata de un producto novedoso en el mercado, que constituye una alternativa a las bebidas gaseosas, cuya calidad microbiológica se presume que es adecuada y su consumo no representa ningún riesgo para la salud. El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo analizar la calidad sanitaria de las aguas minerales envasadas saborizadas expendidas en un Automercado del municipio Libertador del estado Mérida. Para realizarlo, se seleccionaron al azar en un automercado tres muestras de aguas minerales saborizadas de toronja, mandarina y jamaica y una muestra de agua mineral natural, todas pertenecientes a una misma marca. A las muestras seleccionadas se les realizó la determinación de Bacterias Aerobias Mesófilas (BAM) en agar Plate count (PC), Coliformes Totales y Fecales en agar Eosina Azul de Metileno (EAM), *Pseudomonas aeruginosa* en agar Cetrimide y Mohos y Levaduras en agar Saboraud. Los resultados obtenidos evidenciaron la presencia de bacterias aerobias mesófilas igual a 6UFC/100mL en una de las muestras de agua saborizada, no hubo crecimiento de coliformes ni de *Pseudomonas aeruginosa* en ninguna de las muestras, se observó crecimiento de Mohos y Levaduras igual a 1UFC/100mL en dos de las muestras de agua saborizada analizadas. Las aguas minerales saborizadas cumplen con los requisitos microbiológicos establecidos en la Norma COVENIN 1431-82 Agua Potable envasada, por lo que se considera que su calidad sanitaria es aceptable.

Palabras claves: Agua mineral, agua saborizada, calidad sanitaria, indicadores de calidad sanitaria, microorganismos, Venezuela.

INTRODUCCIÓN

El agua es un componente de la naturaleza que ha estado presente en la tierra desde hace más de tres mil millones de años, ocupando tres cuartas partes de la superficie del planeta. Existen reservas acuosas en formaciones geológicas profundas que almacenan el agua de lluvia que ha sido filtrada a través de piedras y suelos. En este recorrido a las profundidades, las aguas se cargan de minerales, que las transforman en fuentes de nutrientes y elementos químicos provechosos para la salud de quienes las consumen (Fortunecity, 2000; Richards y col., 1992).

El agua mineral se encuentra ampliamente disponible de forma embotellada tanto en países industrializados como en desarrollo. Los consumidores pueden comprar agua envasada por diversos motivos, por su sabor, por la comodidad o por moda; no obstante, para muchos consumidores son importantes su inocuidad y posibles propiedades saludables (OMS, 2006).

Las aguas saborizadas embotelladas son aguas minerales adicionadas de saborizantes naturales o artificiales, que se han convertido en una alternativa para la ingesta de agua por parte de las personas a las que les resulta desagradable el agua natural. Este tipo de aguas, son un producto innovador dentro del mercado y están siendo aceptadas por los consumidores sustituyendo a aquellas bebidas carbonatadas o bebidas azucaradas que resultan perjudiciales a la salud (Bonilla y Henríquez, 2014).

En los últimos años, la preocupación sobre la calidad del agua que se consume se ha generalizado entre la población. El sabor desagradable y la aparición de diarreas asociadas al consumo de agua potable han sido la causa del aumento en el consumo de agua embotellada. Según un estudio

de mercado realizado por Beverage Marketing Corp, en muchos países, el valor comercial del agua embotellada es mil veces mayor que el agua potable. Debido a esto, diariamente se incrementa el número de interesados en la producción de agua embotellada. Paralelo al aumento del consumo, se encuentra la preocupación por la calidad microbiológica de este producto, considerando que la información al respecto es muy limitada (Chaidez, 2002).

Respecto a las patologías de origen bacteriano asociadas al consumo de agua, las salmonelosis y la fiebre tifoidea han descendido espectacularmente debido al tratamiento, distribución y control del agua. Las shigellosis presentan un origen hídrico importante. Asimismo, ha quedado demostrada la acción de algunos *Escherichia coli* enterotóxicos en las epidemias de diarrea de los viajeros, así como su origen hídrico. Actualmente se consideran las especies *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* como agentes frecuentes de gastroenteritis y diarreas. También cabe destacar la frecuencia con la que *Yersinia enterocolitica* está implicada en la etiología de las gastroenteritis hídricas (Larrañaga y col., 1999).

Entre los virus patógenos de mayor relevancia transmitidos por el agua se encuentran los Rotavirus y Virus de la Hepatitis A (APHA, 2001; Mims y col., 1999). Su tamaño microscópico les permite pasar, sin ser afectados, a través de las plantas de tratamiento de aguas residuales (Gray, 1996). Adicionalmente, su baja concentración, su gran variedad de tipos, su inestabilidad como entidad biológica y las limitaciones en sus métodos de identificación y estimación en el agua, hacen que su detección sea difícil (APHA, 1981; Payment, 1991).

Por otra parte, el agua embotellada muy pocas veces se encuentra completamente libre de microorganismos. Después del embotellado, la cuenta bacteriana en el contenedor aumenta rápidamente gracias al contenido de materia orgánica presente. Este aumento tiende a ser mayor en

aguas no carbonatadas y en contenedores plásticos. Las bacterias predominantes en aguas envasadas incluyen *Pseudomonas* spp., algunas de las cuales son oportunistas, lo que resalta la importancia de realizar un adecuado control de calidad y un constante monitoreo durante la producción de agua mineral envasada (Díaz y col., 2007).

Por todo lo expuesto anteriormente, el objetivo principal del presente trabajo de investigación consistió en analizar la calidad sanitaria del agua mineral envasada saborizada que se expende en un Automercado del Municipio Libertador del estado Mérida.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del Problema

A través de la historia de la humanidad, la búsqueda de un agua clara, limpia, fresca y potable ha sido una prioridad. Durante las últimas décadas, se han llevado a cabo una serie de esfuerzos para servir a las comunidades con suficiente agua potable, pero sólo durante las dos últimas décadas, se han desarrollado criterios de calidad tanto químicos como microbiológicos para el agua de consumo (Andueza, 2010).

Lafuente y col. (2000), definen el agua como un compuesto químico, incoloro, inodoro e insípido, cuya molécula está constituida por dos átomos de hidrógeno unidos a uno de oxígeno, separados entre sí aproximadamente 105° . El agua representa un elemento esencial para la vida. Entre el 60 y 65% del peso del cuerpo se debe al agua, distribuida en 50.000 millones de células. El consumo de este líquido, por lo tanto, resulta indispensable para el buen funcionamiento del cuerpo, así como para el cumplimiento de sus funciones vitales. En el agua están disueltas casi todas las sustancias que forman y nutren el cuerpo, por esto se le conoce como el solvente universal. Sus funciones en el organismo son tan múltiples como indispensables: hidrata, limpia y drena el intestino y los riñones, es un efectivo diurético; además regula la temperatura corporal (Jácome y col., 2010).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1969, consideró como agua mineral natural, aquella bacteriológicamente incontaminada, procedente de fuentes subterráneas, con un mínimo de mineralización de 1g por kilogramo de agua y 250 mg de CO₂ libre, con propiedades favorables para la salud, según criterios admitidos por el Comité Coordinador de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) (Armijo y col., 1994).

En la Norma Venezolana COVENIN (1982), se define el agua envasada o embotellada como aquella que es apta para el consumo humano, contenida en recipientes apropiados, aprobados por la autoridad competente y con cierre hermético inviolable, el cual deberá permanecer en tal condición hasta que llegue a manos del consumidor final.

El agua la podemos encontrar en diferentes presentaciones, desde recipientes con volúmenes mayores contenidos en galones, hasta botellas y bolsas de 600 mL del líquido. El agua envasada es producto de un largo procedimiento que inicia desde la elección de la fuente apropiada, continuando con el abastecimiento, tratamiento hasta llegar al envasado (Macías, 2015).

Como casi todos los productos alimenticios, el agua envasada no es un producto libre de microorganismos, específicamente de bacterias que se encuentra en forma natural en los suministros de agua. 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 cuenta total bacteriana, que puede alcanzar números de hasta 10⁵ unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL). Si no se toman las precauciones sanitarias adecuadas, el agua embotellada puede contener bacterias, las cuales se originan antes del envasado, y que después de haberse envasado, éstas se reproducen a

concentraciones que podrían representar un riesgo a la salud (Chaidez, 2002).

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs), son en su mayoría de origen microbiano y constituyen uno de los problemas más comunes en salud pública a nivel mundial, donde los alimentos y el agua contaminada son fuentes importantes de transmisión según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) (Fuentes y col., 2005).

Cuando se establecieron las relaciones entre enfermedad y consumo de agua, las tecnologías para su tratamiento y desinfección se desarrollaron rápidamente. Paralelamente las autoridades de salud de cada país elaboraron estándares de calidad para el agua potable. De esta manera Instituciones como la Organización Mundial de la Salud (OMS), agencia especializada en asuntos de salud de la Organización de Naciones Unidas (ONU), en el año 1984 publica una guía para el control del agua potable (WHO, 1984). De igual forma la Comunidad Económica Europea (EEC) promulga en el año 1980 unas directrices sobre la calidad y los estándares de calidad química y microbiológica del agua de consumo, así como también lo hizo el Codex alimentario internacional (Andueza, 2010).

La calidad del agua de consumo humano estriba en que sea salubre y limpia. Se considera agua apta para el consumo aquella que no contenga ningún tipo de microorganismo, parásito o sustancia, en tal cantidad que pueda implicar un riesgo para la salud humana y que cumpla con las determinaciones de la norma respectiva en su calidad microbiológica y química (Martínez y Pérez., 2010).

Algunas empresas utilizan agua potable como materia prima principal, y las bacterias que residen en el agua pueden aparecer en el producto final una vez que el agua es procesada. Además, las prácticas higiénicas deficientes del personal que participa en el procesamiento del agua, aunado

al manejo inadecuado de los envases, dan como resultado un aumento de la población bacteriana en el producto final (Chaidez, 2002).

Particularmente en Venezuela, la infraestructura para la distribución del agua potable está bien desarrollada, sin embargo, la falta de mantenimiento de la red de distribución permite que esta agua pueda albergar contaminantes de origen químico y microbiológico. Por esta razón, y por la errónea idea de que el agua de las tuberías es de mala calidad, en las áreas urbanas del país se ha venido observando un sostenido aumento el consumo de agua mineral envasada (Andueza, 2009.; OPS-OMS, 1998).

De esta manera, Di Nucci (2011), expresa que desde la década de los noventa han surgido una gran cantidad de marcas nuevas muy económicas en bebidas gaseosas elaboradas por empresas con distinta escala de mercados locales, regionales y hasta nacionales. Recientemente, uno de los cambios más notables para las bebidas sin alcohol y las gaseosas fue la aparición de un nuevo producto en el año 2003: el agua saborizada, creado por la empresa multinacional francesa Danone, para ser producida y consumida en Argentina. Este producto surge como una manera de aumentar en el país el consumo de agua mineral, en este caso saborizada a un precio accesible, a diferencia de otros países del mundo.

La producción de aguas saborizadas tiene un mercado con forma de oligopolio concentrado, donde un reducido número de vendedores, controlan y acaparan las ventas. El explosivo crecimiento en el consumo de aguas saborizadas es resultado de un cambio de hábitos de consumidores de gaseosas, de consumidores de aguas minerales y de nuevos compradores que no consumían las bebidas mencionadas (Di Nucci, 2011).

Además del aumento y la aceptación del agua envasada, esta industria es una de las de mayor auge, con tasas de crecimiento anuales por encima del 7% a nivel mundial (Naddeo y col., 2007; Pérez, 2011), lo que a su vez podría incrementar el riesgo de afectar la salud de un mayor número

de consumidores, en caso de que el agua envasada no cumpla con los estándares microbiológicos y fisicoquímicos de calidad (Reyes y col., 2008).

Debido al incremento considerable de diferentes marcas de agua mineral saborizada, nace la inquietud que muchas veces tienen los consumidores por saber el estado real de las aguas embotelladas que son vendidas como libres de microorganismos. La importancia de conocer sobre la calidad del agua embotellada, radica en saber si el producto cumple con las expectativas tanto de los consumidores como de los requisitos que debe obedecer el producto de acuerdo a la normatividad para su calidad sanitaria (Skoog y col. 2001).

La contaminación microbiológica en el agua envasada se ha reportado por diferentes autores alrededor del mundo. Jeena y col (2006), reportaron 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 éstas el 44% presentaron coliformes totales. Asimismo, Kassenga (2007), estableció que el 92% de las muestras de agua envasada procedentes de diferentes sitios de expendio en Tanzania, presentaron BHT y coliformes fecales en una proporción de aproximadamente 3.6%. Por otro lado, en Londrina, Brasil, Da Silva y col. (2008), determinaron que la presencia de coliformes totales y fecales, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus* spp. y bacterias heterotróficas en agua, aumentaba 42.2% debido al proceso inadecuado de envasado. En Colombia, Gomes y col. (2001), reportaron coliformes fecales en el 27% del agua envasada y en el 81% de las bolsas de empaque del producto expendido de manera ambulante en la ciudad de Cartagena (Vidal y col., 2009).

Diversos autores afirman que las bacterias crecen cuando el cloro o el ozono añadidos al agua envasada se han disipado, y predominan sobre todo los bacilos Gram negativos. El porcentaje de bacterias pigmentadas es

muy variable, pero en el agua embotellada puede llegar a ser la población dominante, encontrándose con frecuencia los géneros *Flavobacterium* y *Pseudomonas* pigmentadas, en ocasiones *Chromobacterium*, *Mycobacterium* entre otros. Ocasionalmente *Pseudomonas aeruginosa* coloniza las instalaciones de la planta embotelladora. El agua mineral natural embotellada suele contener proteobacterias (97%), actinobacterias (2%) y otras (1%). El género *Legionella* puede sobrevivir en agua de bebida así como también los géneros *Aeromonas* y *Asai*, este último agrupa bacterias acéticas que han sido aisladas de agua con sabor frutal (Downes y col., 2001; Kuhn y col., 1997; Moore y col., 2002; States y col., 1987).

Se ha establecido que el número de bacterias puede incrementarse durante el proceso de almacenaje hasta que es consumida. Se han encontrado patógenos como *Escherichia coli*, *Pseudomonas* spp. Y *Salmonella* spp; capaces de sobrevivir y multiplicarse en el agua embotellada, representando un riesgo potencial en el desarrollo de enfermedades en los consumidores (Hunter y col., 1990; Tobin, 1984).

La cuenta total bacteriana en diversas aguas de consumo humano ha generado gran preocupación con respecto a la salud humana. En este sentido, las bacterias heterotróficas frecuentemente encontradas en aguas, se definen como bacterias que utilizan el carbono orgánico como fuente de nutrientes. Generalmente, la mayoría de estas bacterias no son patógenas; sin embargo, algunos miembros de este grupo, incluyendo *Legionella* spp., *Micobacterium* spp., *Pseudomonas* spp, y *Aeromonas* spp., pueden ser patógenas oportunistas (Chaidez, 2002; Rusin y col., 1997).

En Galápagos-Ecuador, se presentó un brote de diarrea que afectó a 60 personas, debido al consumo de agua embotellada. Tras una inspección sanitaria, las autoridades suspendieron a cinco envasadoras porque no realizaban buenas prácticas en el proceso de manufactura (Macías y col., 2010). La industria venezolana del agua embotellada, no se encuentra

exenta de sufrir de muchos de los problemas de contaminación que hasta ahora se han presentado en diversos lugares del mundo. Por esta razón, es necesario alertar e informar sobre las características microbiológicas de la misma.

Tomando en cuenta que la ingesta de aguas minerales envasadas saborizadas se ha incrementado en la población venezolana en los últimos años, debido a que éstas se consideran de mejor calidad para el consumo humano, surge la siguiente interrogante de investigación: ¿Cuál es la calidad sanitaria de las aguas minerales envasadas saborizadas expendidas en un Automercado del municipio Libertador del estado Mérida?

JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

A pesar de la existencia de sistemas de potabilización del agua para consumo humano en la mayoría de los países del mundo, la calidad microbiológica de ésta no siempre es adecuada, razón por la cual el agua embotellada se ha vuelto una opción para el consumo. El agua es uno de los elementos naturales que se encuentra en mayor cantidad en el planeta Tierra, es una necesidad fundamental, donde cada persona requiere al menos veinte a cincuenta litros de agua potable limpia y segura al día para beber, cocinar y simplemente mantenerse limpios.

Además el agua es una sustancia química natural abundante formada por moléculas de hidrógeno y oxígeno, que constituye aproximadamente el 55-60% de la masa corporal de una persona adulta y en el cuerpo humano se encuentra en los fluidos, las células, y por lo tanto los tejidos. A pesar de que las aguas minerales envasadas son tomadas directamente desde manantiales y acuíferos libres de cualquier tipo de contaminación y

elementos químicos, su composición microbiana puede variar una vez que ingresan en la planta envasadora.

Su importancia radica en que constituye un elemento básico en cualquier industria, ya que puede ser empleada como materia prima, por esta razón se requiere que la disponibilidad y uso de los sistemas de suministro de agua potable sean apropiados, así como el acatamiento de las medidas de higiene para consumo humano en la mayoría de los países del mundo.

No obstante, los consumidores de agua envasada desconocen el hecho de que en ocasiones y de acuerdo a la marca que consuman, están ingiriendo la misma calidad de agua que si la tomaran directamente del grifo o incluso de la calle. Por esta razón es preciso analizar la calidad microbiológica de las aguas envasadas para consumo humano, teniendo en cuenta que las bacterias que se encuentran con mayor frecuencia en el agua son bacterias entéricas que colonizan el tracto gastrointestinal del hombre y son eliminadas a través de la materia fecal por su capacidad de soportar temperaturas más elevadas.

En relación con las aguas saborizadas envasadas, éstas son aguas minerales complementadas con saborizantes naturales o artificiales, que se han transformado en una opción para la ingesta de agua por parte de las personas a las que les resulta insípido el agua natural.

La presente investigación se considera relevante para la población en general ya que se trata del estudio de la calidad sanitaria de un producto ampliamente consumido por personas de todas las edades y cuya manipulación sanitaria inadecuada podría desencadenar problemas gastrointestinales entre otros síntomas.

Por otra parte, los aportes teóricos de la presente investigación, podrían constituir basamentos para las personas involucradas en la gestión de los servicios de salud, a su vez, podrán ser fuentes de inspiración a

futuras investigaciones para ampliar el conocimiento en esta área de estudio en particular, como lo es la microbiología de aguas.

En cuanto al aspecto metodológico, esta investigación constituye un aporte en la identificación de los microorganismos que eventualmente pueden estar presentes en aguas embotelladas y pudiese constituir un aporte para los organismos competentes, respecto a la creación de una normativa específica para agua mineral saborizada que actualmente no existe en Venezuela.

www.bdigital.ula.ve

OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

Objetivo General

Analizar la calidad sanitaria de las aguas minerales saborizadas expendidas en un Automercado del Municipio Libertador del Estado Mérida.

Objetivos Específicos

- ✓ Recolectar muestras de agua mineral y agua saborizada
- ✓ Cuantificar las bacterias aerobias mesófilas presentes en las muestras de agua mineral y aguas minerales saborizadas.
- ✓ Detectar coliformes totales y fecales en las muestras de agua mineral y aguas minerales saborizadas.
- ✓ Identificar la presencia de *Pseudomonas aeruginosa*, como indicador de calidad sanitaria en las muestras de agua mineral y aguas minerales saborizadas investigadas.
- ✓ Cuantificar la presencia de mohos y levaduras en las muestras de agua mineral y aguas minerales saborizadas estudiadas.
- ✓ Determinar qué cantidad de microorganismos presentan el agua mineral y las aguas minerales saborizadas.
- ✓ Conocer cuáles son los microorganismos de importancia sanitaria que se encuentran con mayor frecuencia en el agua mineral y las aguas minerales envasadas.

Alcances y Limitaciones de la Investigación

Alcances de la investigación

- ✓ El presente estudio abarca exclusivamente una marca de agua saborizada expendida en un único automercado del municipio Libertador del estado Mérida.
- ✓ La proyección del estudio servirá de base para determinar la calidad microbiológica de agua saborizada para futuros estudios.

Limitaciones de la Investigación

- ✓ Ausencia de una norma específica para aguas saborizadas.
- ✓ Falta de referencias bibliográficas sobre estudios microbiológicos realizados en aguas saborizadas.
- ✓ Escasez de marcas del producto en estudio.
- ✓ Recursos económicos escasos para adquirir los materiales de laboratorio.
- ✓ No se realizó siembra de las muestras por duplicado ni triplicado por limitaciones económicas y falta de material.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

Trabajos Previos

Delgado y Morales (2015), realizaron un trabajo de investigación cuyo objetivo principal fue la detección de *Pseudomonas aeruginosa* y bacterias heterótrofas de aguas destinadas al consumo humano, envasadas en botellas y bolsas plásticas, comercializadas en la ciudad de Managua en Nicaragua. Para esto utilizaron como muestra diez marcas de agua envasada obtenidas en distintos puntos de ventas de la ciudad y cada muestra se ensayó por el método del Número Más Probable (NMP) para *Pseudomonas aeruginosa* los resultados evidenciaron que un 8% de las muestras pertenecientes a una misma marca de agua presentaron un índice del NMP para *Pseudomonas aeruginosa* por encima de lo establecido (1,2 NMP/100mL). Respecto a las bacterias heterótrofas los resultados demostraron que el 24% de las muestras sobrepasan el rango de referencia según la norma venezolana COVENIN (100 UFC/mL), las cuales corresponden a doce muestras de cuatro marcas analizadas.

Por su parte, Bonilla y Henríquez (2014), desarrollaron un estudio cuyo objetivo fue determinar la calidad microbiológica y fisicoquímica que presentan las aguas saborizadas embotelladas comercializadas en los supermercados Metrocentro y Metrosur de San Salvador, en El Salvador. La investigación fue de tipo prospectivo y diseño experimental, el muestreo que se empleó fue dirigido y puntual, y se seleccionaron 30 muestras de aguas saborizadas embotelladas de diferentes sabores. A cada muestra de agua

saborizada se le realizaron análisis microbiológicos tales como determinación de Aerobios Mesófilos Heterótrofos, Coliformes totales, *Escherichia coli*, y *Pseudomonas aeruginosa*; así como análisis fisicoquímicos: pH, temperatura y turbidez. Como resultado se obtuvo que la totalidad de las muestras analizadas resultaron conforme para todos los parámetros microbiológicos; en cuanto a los análisis fisicoquímicos, se obtuvo para temperatura, olor, sabor, turbidez y sólidos totales disueltos que la totalidad de las muestras cumplen con las especificaciones de las Normas Salvadoreñas obligatorias NSO 13.07.02:08, por lo tanto los autores concluyeron que las muestras de agua saborizadas embotelladas cumplen con la normativa Salvadoreña, siendo estas aptas para el consumo humano.

De manera similar, Dugarte y Rojas (2012), realizaron una investigación denominada —Microbiota bacteriana heterótrofa de aguas minerales envasadas de consumo en los municipios Libertador y Campo Elías del estado Mérida—. Dicho estudio consistió en la evaluación microbiológica de once marcas de agua mineral envasada seleccionadas al azar, determinando para cada muestra la microbiota bacteriana heterótrofa presente. Los resultados de dicho estudio evidenciaron la presencia de bacterias aerobias mesófilas (90,90%), coliformes totales y fecales (72,72%) y presencia de *Pseudomonas* (18,18%). A su vez las especies aisladas fueron *Hafnia alvei*, *Pseudomonas fluorescens*, *Chromobacterium violaceum*, *Burkholderia cepacia*, *Pantoea* spp. y *Escherichia coli*, con valores entre <1 UFC/mL hasta $>2.0 \times 10^3$ UFC/mL. Razón por la cual los autores recomiendan a las envasadoras de agua mineral, establecer sistemas de control microbiológico antes, durante y después del envasado a fin de obtener un producto con una calidad sanitaria aceptable.

Por su parte, Araque (2012), realizó un estudio microbiológico de las aguas minerales envasadas, con el objetivo de conocer la calidad microbiológica, los patrones de resistencia antimicrobiana de la microbiota

presente y los índices de biodiversidad microbiana de las principales marcas de agua minerales envasadas expendidas en diversas ciudades de Venezuela. La investigación fue de tipo descriptivo y diseño experimental, para ello se llevaron a cabo los siguientes procedimientos: determinación del pH, la temperatura y tratamiento de la muestras, cuantificación, recuento, aislamiento e identificación de microorganismos, identificación de bacterias heterótrofas; realizando diferentes pruebas bioquímicas, identificación de hongos, criterios de clasificación, determinación de perfiles de resistencia antimicrobiana, determinación de los índices de biodiversidad y finalmente tratamiento estadístico de los resultados. Los resultados de la autora evidenciaron la presencia de un gran número y diversidad de microorganismos tanto saprofitos como oportunistas, así como variados patrones de resistencia antimicrobiana.

De manera similar, Martínez y Pérez (2010), realizaron estudios sobre la calidad bacteriológica del agua potable envasada comercialmente en Ciudad Bolívar en Venezuela. El procesamiento de las muestras fue llevado a cabo por los autores siguiendo las normas establecidas por COVENIN (2614-94, 1126-89, 902-87) para la calidad de agua de consumo, utilizando como indicadores de contaminación la presencia de coliformes totales y fecales, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus* spp. y *Clostridium* sp., así como el recuento de bacterias aerobias mesófilas. Las muestras fueron adquiridas en distintos establecimientos de venta, estudiando 5 marcas comerciales y 5 botellas de cada marca comercial analizada.

Dichas muestras fueron procesadas en el Laboratorio Bacteriológico de Aguas de la Universidad de Oriente, Núcleo Bolívar. Como resultado se obtuvo un recuento de menos de 100 UFC/mL de aerobios mesófilos en las muestras analizadas. En relación a los coliformes totales y fecales en el agua potable el hallazgo fue de $\leq 2,2$ NMP/mL. Todas las muestras analizadas por los autores fueron negativas para *Escherichia coli*, *Pseudomonas*

aeruginosa, *Enterococcus* spp. y *Clostridium* sp. Por lo tanto se concluyó que el agua potable envasada comercialmente para el período evaluado por los autores resultó apta para el consumo humano. Esta investigación coincide con este estudio ya que estudiaron la presencia microorganismos patógenos en agua potable envasada comercialmente.

Carrero y Morales (2010), efectuaron un trabajo similar en el que evaluaron la microbiota de las aguas minerales envasadas. Para esto estudiaron cinco marcas de agua mineral que se expenden en la zona fronteriza Colombia, Venezuela (específicamente entre Cúcuta y San Cristóbal). Los resultados de los análisis demostraron la presencia de bacterias aerobias mesófilas en cuatro de las marcas estudiadas, confirmando además la presencia de *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas putida*, ambas especies en dos de las muestras estudiadas. Mediante el sistema de identificación Api 20 NE V6O, Api CORYNE V2.0 y Api STAPH V4.0, se pusieron en evidencia los géneros *Weeksella virosa* (32%), *Arthrobacter* spp. (17%) y *Kocuria rosea* (17%). El presente estudio arrojó que el 80% de las muestras de aguas minerales envasadas analizadas presentan bacterias potencialmente patógenas para el consumidor.

En Colombia, Vidal y col. (2009), ejecutaron una evaluación de la calidad microbiológica del agua envasada en bolsas producida en Sincelejo, Colombia con destino al consumo humano. Para la estimación de organismos coliformes totales y fecales, *Pseudomonas aeruginosa* y aerobios mesófilos en el agua envasada de 13 marcas, utilizaron el método de filtración por membrana. Se obtuvo como resultado que el 92% de las marcas de agua envasada en bolsas producidas en la ciudad de Sincelejo presentaron bacterias aerobias mesófilas en su producto, mientras que en el 33% de las mismas se encontraron coliformes totales.

Los autores destacaron que una marca presentó *coliformes fecales*, otra *Pseudomonas aeruginosa* y que el reporte microbiano fue mayor en las

envasadoras que poseían el registro sanitario del Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA). De esta forma dedujeron que gran parte del agua envasada en bolsas de la ciudad de Sincelejo genera un riesgo a la salud de los consumidores, debido a la presencia de microorganismos patógenos, lo que está relacionado con inadecuados procesos de producción y a la intermitencia del suministro del agua utilizada como materia prima.

Antecedentes Históricos

El origen de las aguas minerales envasadas podemos ubicarlo en los inicios de la civilización, cuando nuestros antepasados se vieron en la necesidad de transportar el agua de un sitio a otro, o cuando necesitaron almacenarla. Es importante señalar que desde el principio, el agua mineral ha estado asociada con el desarrollo de formas terapéuticas o medicamentos para restituir la salud de las personas. Hipócrates en su tratado sobre aires, aguas y lugares alude a las aguas minerales estableciendo su uso y contraindicaciones. Los griegos desarrollaron toda una escuela de cómo utilizar las aguas minerales como recursos terapéuticos para curar múltiples dolencias (Jackson, 1990; Tampo, 2004).

Los romanos fomentaron el uso de las aguas minerales como medicamentos e hicieron muchas aportaciones que conllevaron a lo que se ha denominado la doctrina románica. Esta ideología consideraba como un producto natural, específico de cada manantial y que debía observar normas relativas a la estabilidad y constancia de su composición química, sus características físicoquímicas y la conservación de su pureza original, a fin de ejercer su influencia benéfica y medicinal sobre el organismo del ser humano (Lamoreaux y col., 2001).

En América también el agua mineral estuvo asociada a la cura de enfermedades. Así se tiene que en el año 1767 se da inicio a la venta del agua mineral proveniente de manantial Jackson en Boston, dada a la gran demanda que tenían estas aguas por su poder curativo en diversas enfermedades. En el año 1800 aguas provenientes de manantiales cercanos a Albania en New York fueron envasadas para su uso comercial. De igual forma en 1820 aguas de manantiales ubicados en Saratoga fueron envasadas para la venta. En América del Sur, en Brasil, en el año 1890 se tiene información de envasado del agua de manantial de Sao Lourenco, con fines comerciales (Chapelle, 2005).

En Europa, específicamente en Francia, durante el año 1873 se instala la primera planta envasadora de agua mineral. Esta planta se instala para envasar agua de los manantiales de Saint Galmier en Badoit. Posteriormente, ese mismo año se instala la envasadora Perrier, así como otras plantas de diversos países europeos. En un principio el agua era envasada en recipientes de vidrio y las botellas de plástico no fueron utilizadas sino hasta mediados del siglo XX.

Las aguas envasadas saborizadas son un producto relativamente nuevo, y comenzaron a desarrollarse en el año 2006, a fin de implantar nuevos mercados y a su vez incrementar las ventas; fueron introducidas por Embotelladores de Agua Internacional (IWBA) con su marca Alpina, quien lanzó al mercado —Alpinita Magicll, una botella de agua con un toque de sabor dirigido al mercado infantil (Bonilla y Henríquez., 2014).

Posteriormente se lanza al mercado, otra marca con agua saborizada llamada Salvavidas, por una empresa Guatemalteca que se une con la Asociación Nacional del Café (ANACAFÉ) en el año 2002 para combinar el café con el Agua Pura Salvavidas, y hacer una bebida un tanto más atractiva para el consumidor, así se fue desarrollando la incorporación a El Salvador con sus presentaciones de agua potable, para el año 2013 lanza al mercado

su producto Agua Salvavidas Saborizada siendo esta otra opción para el consumidor (Cantizzano, 2006; ICONTEC, 2012).

Para el año 2007 Pepsi-Cola Venezuela incorpora en el mercado venezolano la primera agua saborizada Minalba Flavor, un producto sin gas, sin color y sin calorías de diferentes sabores (limón, toronja rosada y naranja). Pretendiendo de esta manera crear un nicho de las saborizadas, con diferentes opciones para diferentes consumidores (Camel, 2007). Hoy en día la cultura del agua mineral envasada se ha diseminado por todo el mundo y constituye una floreciente industria que moviliza billones de dólares en todo el planeta (Chapelle, 2005).

www.bdigital.ula.ve

BASES TEÓRICAS

Microbiología

Es la rama de la biología que estudia seres vivos de tamaño microscópico que existen como células aisladas o asociadas y también incluye el estudio de virus (microscópicos no celulares). En general, los microorganismos a diferencia de los macroorganismos, son capaces de llevar a cabo procesos de crecimiento, generación de energía y reproducción, independientemente de otras células sean del mismo tipo o diferentes (Apella y col., 2012).

Microbiología de las aguas

Estudia la estructura y vida de los microorganismos que se encuentran circulantes en el agua, esta ciencia está relacionada con ciertas especializaciones hidrológicas como la hidroquímica, hidrobotánica y la hidrozoología. La flora bacteriana de las aguas no es uniforme en modo alguno, sino que es muy variable según la clase de agua de la que se trate. En el agua se encuentran microorganismos que se alimentan de compuestos orgánicos, dichos microorganismos además presentan diferentes tamaños y formas, particularmente la mayoría de bacterias que predominan en las aguas son del tipo Gram negativas. Cabe destacar además, que la mayor parte de las bacterias del agua son móviles y pueden vivir libremente en ella (Rheinheimer, 1987).

El agua contiene suficientes sustancias nutritivas para permitir el desarrollo de diferentes microorganismos. Muchas de las bacterias del agua provienen del contacto con el aire, el suelo, animales o plantas vivas o en descomposición, fuentes minerales y materias fecales (APHA, 1992).

Calidad sanitaria del agua

Desde el punto de vista microbiológico, el examen de la calidad sanitaria del agua tiene por objeto determinar la presencia de ciertos grupos de bacterias, que revelen una contaminación reciente por materia fecal o materia orgánica, siendo el criterio más utilizado la determinación de la clase y el número de microorganismos que esta contiene. Tradicionalmente se han usado ensayos de microorganismos indicadores que permiten estimar la presencia de microorganismos patógenos. El grupo de bacterias coliformes (figuras 1 y 2) ha sido siempre el principal indicador de calidad sanitaria de distintos tipos de agua, el número de coliformes en una muestra, se usa como criterio de contaminación y, por lo tanto, de calidad sanitaria de la misma (Martínez y col., 2010).

Las Bacterias Aerobias mesófilas (figura 3) constituyen un indicador de calidad sanitaria para estimar la efectividad del tratamiento de desinfección de las aguas. La presencia de microorganismos pertenecientes al género *Pseudomonas* (figura 5) señala deterioro en la calidad del agua o una recontaminación. Desde el punto de vista bacteriológico, para definir la potabilidad del agua, es preciso investigar bacterias aerobias mesófilas y, coliformes totales y fecales. La gran sensibilidad de las bacterias aerobias mesófilas a los agentes de cloración, las ubica como indicadoras de la eficacia del tratamiento de potabilización del agua. Las normas bacteriológica de calidad de las aguas de consumo humano establecen que el agua debe estar exenta de patógenos de origen entérico y parasitario intestinal que son los responsables de transmitir enfermedades como salmonelosis, shigelosis, amebiasis, entre otras (Apella y col., 2005).

Indicadores de Calidad Sanitaria

1. Coliformes

1.1 Coliformes totales

Son un grupo de microorganismos que comprenden varios géneros de la familia *Enterobacteriaceae*. Este grupo de microorganismos se encuentra ampliamente difundido en la naturaleza, agua y suelo, además, son habitantes normales del tracto intestinal del hombre y animales de sangre caliente (Aurazo, 2009). El grupo de bacterias coliformes totales comprende todos los bacilos Gram negativos aerobios o anaerobios facultativos, oxidasa negativa, no esporulados, que fermentan la lactosa con producción de gas en un lapso máximo de 48 h a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (figura 1). Este grupo está conformado por cuatro géneros principalmente: *Enterobacter*, *Escherichia*, *Citrobacter* y *Klebsiella*, también en algunos casos se puede considerar a *Serratia* (Grüber y Mata 2010).



Figura 1. Crecimiento de bacterias coliformes totales en agar EMB

Fuente: Baggini (2014).

1.2 Coliformes fecales

También denominados coliformes termotolerantes, son llamados así porque fermentan la lactosa con producción de ácido y gas a $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ en 24 horas. Comprenden un grupo muy reducido de microorganismos, los cuales son indicadores de calidad sanitaria, ya que son de origen fecal. En su mayoría están representados por el microorganismo *Escherichia coli*, pero se pueden encontrar, entre otros menos frecuentes, *Citrobacter freundii* y *Klebsiella pneumoniae*, tal como se observa en la figura 2 (Hayes, 1993).

Los coliformes fecales integran el grupo de los coliformes totales, pero se diferencian de los demás organismos que hacen parte de este grupo, en que son indol positivo, su rango de temperatura óptima de crecimiento es muy amplio (hasta 45°C) y son mejores indicadores de higiene en alimentos y en aguas, la presencia de estos indica presencia de contaminación fecal de origen humano o animal, ya que las heces contienen dichos microorganismos, presentes en la flora intestinal y de ellos entre un 90% y un 100% son *E. coli* mientras que en aguas residuales y muestras de agua contaminada este porcentaje disminuye hasta un 59% (Gómez y col., 1999).

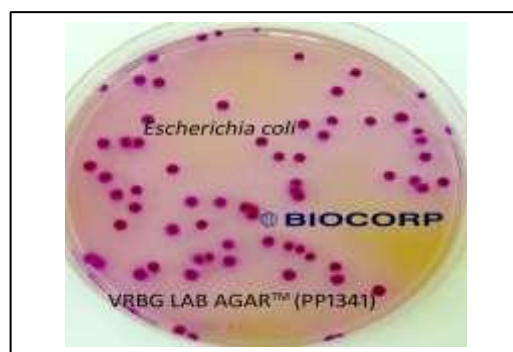


Figura 2. Crecimiento de coliformes fecales en agar bilis rojo violeta glucosa
Fuente: Baggini (2014).

Bacterias Aerobias Mesófilas (BAM)

En este grupo se incluyen todas las bacterias capaces de desarrollarse a 30°C en las condiciones establecidas. En este recuento se estima la microflora total sin especificar tipos de microorganismos. Refleja la calidad sanitaria de un alimento, condiciones de manipulación, las condiciones higiénicas de la materia prima (Figura 3). Un recuento bajo de aerobios mesófilos no implica o no asegura la ausencia de patógenos o sus toxinas, de la misma manera un recuento elevado no significa presencia de flora patógena. Un recuento elevado puede significar:

- ✓ Excesiva contaminación de la materia prima
- ✓ Deficiente manipulación durante el proceso de elaboración
- ✓ La posibilidad de que existan patógenos
- ✓ La inmediata alteración del producto (Bonilla y Henríquez., 2014).



Figura 3. Crecimiento de Bacterias Aerobias Mesófilas en agar Plate Count
Fuente: Baggini (2014).

Las Bacterias Aerobias Mesófilas pueden encontrarse en los alimentos y aguas, ellas crecen en un rango de temperatura óptima de 30 a 37°C. Para su determinación se incuban a 30°C empleando agar nutriente o plate count para realizar el conteo (Ballester, 2002). Las bacterias aerobias mesófilas presentes en los alimentos ocasionan alteraciones en los mismos,

desencadenando cambios organolépticos en la mayoría de los casos (excepto en alimentos fermentados) cuando su crecimiento sobrepasan el orden de $10^6 - 10^8$ bacterias aerobias mesófilas por gramo o mililitro, manifestando deterioro evidente del producto o próximo a su manifestaciones (Díaz, 2000; Ramírez y col., 2011).

Mohos y Levaduras

Los hongos pueden ser unicelulares o multicelulares. Los multicelulares grandes, como las setas, pueden asemejarse a las plantas, pero a diferencias de estas, no tienen capacidad de fotosíntesis. Los hongos verdaderos tienen paredes celulares compuestas sobre todo por una sustancia denominada quitina. Los hongos son multiformes en comparación con las bacterias y se diferencian de estas por el mayor tamaño de sus células. Los mohos crecen como blancos, delicados, mullidos, similares a masas algodonosas suspendidas en las bebidas.

Las esporas de hongos o conidias fragmentadas de micelio pueden contaminar las bebidas en las diferentes etapas del proceso de producción. La disponibilidad de agua y la alta acidez son condiciones propicias para los hongos en los refrescos. El máximo y el mínimo valor de pH para el crecimiento dependen de otros factores tales como la actividad del agua, la temperatura o el tipo de ácido utilizado. Por ejemplo, los ácidos cítrico, fosfórico y tartárico promueven crecimiento a pH más bajo. Las esporas de moho no pueden crecer en presencia de carbonatos pero pueden sobrevivir *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Cladosporium* y *Fusarium* se detectan a menudo en refrescos y en entornos de fábrica (Jay, 2000; Filtenborg y col., 2004; Swanson, 2011).

Los hongos inferiores (Ficomietos) son los hongos acuáticos propiamente dichos. Sin embargo, entre los primeros hay también algunos

que viven en el agua, como es el caso, por ejemplo, de diversas especies del género *Ancylistes*. Entre los hongos superiores presentes en las aguas se hayan principalmente representantes de los ascomicetos y de los deuteromicetos u hongos imperfectos (Rheinheimer, 1987).

Las formas unicelulares de los hongos, las levaduras, son microorganismos ovals más grandes que las bacterias. Los hongos filamentosos forman una masa denominada micelio, que está compuesta por filamentos (hifas) que se ramifican y entrelazan. Se reproducen de forma sexual o asexual. Obtienen su nutrición mediante la absorción de materia orgánica de su entorno (Tortora y col., 2007). Las levaduras se consideran el principal deterioro en productos carbonatados, principalmente por su capacidad para resistir altos niveles de carbonatación y bajo pH.

En especial el género *Zygosaccharomyces* y la levadura *Bailii* pueden tolerar moderadamente alta carbonatación y también son capaces de crecer a temperaturas de refrigerador. Otras levaduras fermentativas aisladas de bebidas suaves incluyen los géneros *Saccharomyces*, *Brettanomyces*, *Hanseniaspora*, *Hansenula* y *Pichia*. La mayoría de las especies crecen en un rango de pH de 1,5 a 8,5 teniendo un crecimiento óptimo en el rango de pH de 3,0 - 6,5 (Lawlor y col., 2009; Sperber 2009).

Algunas levaduras pueden servir como indicadores de una mala higiene en las plantas de fabricación, pero no causan deterioro del producto final. Estos incluyen levaduras aerobias rojas tales como *Rhodotorula*, *Sporidiobolus*, *Sporobolomyces* y el género productor de pigmento negro *Aureobasidium*. Estas levaduras suelen predominar en las fábricas de bebidas artificiales y se encuentran típicamente en superficies y lugares difíciles de limpiar y desinfectar (Davenport, 2005; Stratford y col., 2006).

Particularmente en alimentos, los mohos y levaduras son un indicador de calidad sanitaria que refleja las condiciones higiénicas de la materia prima, ambientes y limpieza de los equipos utilizados durante el proceso de

fabricación de los alimentos. Para su determinación se emplea el recuento en placa, utilizando diversos medios de cultivo como el agar sabouraud, agar papa dextrosa, agar extracto de malta, agar micosel, entre otros e incubando durante 5 a 7 días a temperatura ambiente (figura 4).



Figura 4. Crecimiento de Mohos y Levaduras en agar Sabouraud

Fuente: Baggini (2014).

Patógenos

Como resultado de una mala higiene durante el procesamiento, el agua para consumo humano puede contener un alto número de bacterias patógenas. Los patógenos entéricos no pertenecen a los microorganismos de las frutas. Por el contrario, la contaminación resulta directa o indirectamente contacto con las heces. Los patógenos bacterianos pueden permanecer viables en refrescos carbonatados por diferentes períodos (Tribst y col., 2009).

Los Coliformes tales como *Klebsiella*, *Citrobacter* y *Enterobacter*, así como otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae* son generalmente poco tolerantes al ácido, aunque algunos son capaces de proliferar en jugos

con valores de pH por debajo de 4,3 (Lawlor y col., 2009). Por su parte, las especies *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* son considerados indicadores de calidad sanitaria en ciertos grupos de alimentos.

Características de *Pseudomonas aeruginosa*

El género *Pseudomonas* se incluye dentro del grupo general de microorganismos quimioheterótrofos aeróbicos Gram negativos. Son Bacilos flagelados, su tamaño oscila entre 0,5 - 1 µm de ancho por 1,5 - 4 µm de largo. Debido a que no fermentan la glucosa, se les conoce como no fermentadores. Las especies del género *Pseudomonas* puede multiplicarse en aguas que contengan tan solo cantidades mínimas de nutrientes, y son capaces de utilizar una amplia variedad de fuentes de carbono y nitrógeno para crecer en diversos ambientes *P. aeruginosa* pertenece a la familia *Pseudomonadaceae* y es un bacilo con un flagelo polar (Castillo y col., 2009).

El agar Cetrimide, es el medio de cultivo utilizado para el aislamiento selectivo de *Pseudomonas aeruginosa*. El agar Cetrimide permite el crecimiento selectivo de *Pseudomonas aeruginosa* y estimula la formación de pigmentos. Contiene peptona que sirve como fuente de nitrógeno y glicerol que se utiliza como fuente de carbono y energía. La producción de piocianina, pioverdina y piorrubina son estimuladas mediante el cloruro de magnesio y el sulfato potásico en el medio. La cetrimida (bromuro de cetil trimetil amonio) es un compuesto de amonio cuaternario que inhibe una amplia variedad de otros organismos, incluidos otras especies de *Pseudomonas* y organismos relacionados. El crecimiento microbiano se observa en el medio por la aparición de colonias características y la producción de pigmentos. La presencia de color verde-azulado corresponde a la producción de piocianina, mientras que un color verde corresponde a la

producción de pioverdina y un color rosa claro, rojizo o marrón oscuro corresponde a la producción de piorrubina (Mañas, 2009).

Las colonias de *Pseudomonas aeruginosa* en agar cetrimide, luego de 18 a 24 horas de incubación a 42 °C, son grandes, de superficie plana e irregular, de coloración verde grisáceo (figura 5). El pigmento verdoso se difunde en el medio. Los cultivos de este microorganismo en caldo asparagina y caldo acetamida son de color azul verdoso (APHA, 1992).

Esta especie es capaz de formar dos pigmentos, piocianina y fluoresceína; ambos son hidrosolubles, aunque solamente la piocianina es soluble en cloroformo. Estos microorganismos suelen ser muy resistentes a los antibióticos, salvo a la polimixina, gentamicina y carbenicilina (APHA, 1992).



Figura 5. Crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* en agar cetrimida

Fuente: Baggin (2014).

La importancia de *Pseudomonas* como indicador se incrementó, cuando se comprobó su capacidad de inhibir los coliformes, siendo los indicadores de contaminación de agua más usados en el mundo, se corre un gran riesgo de consumir agua con índice de coliformes cero, los cuales

podrían estar inhibidos por *Pseudomonas* (Soares y col., 1996; Vaconcelos y col., 2010).

Staphylococcus aureus

Su presencia en alimentos se interpreta como indicador de contaminación por microorganismos provenientes de la piel, boca y fosas nasales de los manipuladores de alimentos así como falta de higiene en materiales y equipos utilizados en el procesamiento de alimentos. Son células esféricas, Gram positivas, que suelen estar distribuidas en grupos irregulares a manera de racimos de uva; su diámetro es de aproximadamente una micra, son microorganismos inmóviles y no esporulados (figura 6). Crecen en condiciones aerobias, producen catalasa, fermentan carbohidratos con lentitud y producen ácido láctico pero no producen gas. A la temperatura de 37 °C pueden crecer con mayor rapidez, pero su pigmentación es más intensa a temperatura ambiental, de 20 a 25 °C; sus colonias son de color gris a amarillo dorado intenso. Se han identificado varios tipos serológicos que se denominan A, B, C, D, E, F, G y H. La intoxicación por *Staphylococcus aureus* se produce al encontrarse en los alimentos las toxinas que segrega, con el inconveniente de que no alteran el sabor ni el olor del alimento. Estas toxinas son termoestables, soportando hasta una hora a 100 °C; se ven poco afectadas por la deshidratación y las radiaciones gamma. En general, los tipos más resistentes son las toxinas A y la B. La enterotoxina A es la que se asocia más frecuentemente con brotes de intoxicación alimentaria, por lo que las toxinas pueden resistir aunque la bacteria haya muerto durante el proceso de preparación del alimento. Para prevenir las enfermedades transmitidas por alimentos, tanto la higiene personal de los manipuladores de alimentos como la temperatura de almacenamiento de los mismos debe ser adecuada (menor a 6,6 °C o superior a 60 °C) (Calderón, 2009).



Figura 6. Crecimiento de *Staphylococcus aureus* en agar Baird parker

Fuente: Baggini (2014).

Existen diversos factores que influyen en la calidad del agua que consume una población. Entre éstos se encuentran la presencia o ausencia de fuentes de abastecimiento naturales de agua; la infraestructura de redes de almacenamiento y distribución de agua; los aspectos culturales y socioeconómicos que condicionan la aceptación o rechazo a ciertas formas de abastecimiento y potabilización de agua y, por último, factores políticos que afectan la normatividad relativa a la inversión en el desarrollo y mantenimiento de sistemas de abastecimiento de agua potable (Sánchez y col., 2000).

Agua embotellada

Tradicionalmente se ha considerado que el agua embotellada puede ser cualquier fuente de agua potable que recibe tratamientos físicos y químicos, y que está libre de agentes infecciosos. En el mercado existen diferentes presentaciones de agua embotellada, en envases de materiales diversos (figura 7). Las fuentes de las que provienen estas aguas pueden ser

pozos profundos, deshielos de las montañas o bien el suministro municipal de agua. Como cualquier otro producto alimenticio, debe ser procesada, empacada y almacenada de manera sanitaria y libre de contaminación. Además de su uso general, ésta puede ser utilizada para la preparación de fórmulas infantiles, en los asilos de ancianos, para reconstituir alimentos en hospitales, para la limpieza de lentes de contacto y el llenado de los humidificadores del ambiente (Chaidez, 2002; Warburton y col., 1994).



Figura 7. Diferentes presentaciones de agua embotellada

Fuente: Chiappe (2017).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) establece que el agua debe estar libre de *Pseudomonas aeruginosa*, debido a la vulnerabilidad que presentan niños y personas de la tercera edad a esta bacteria. La Asociación Internacional de Agua Embotellada (IBWA) es la autoridad que normatiza la industria del agua embotellada, y la Fundación Nacional para la Ciencia (NSF International) es el organismo auditor más reconocido mundialmente, designado por la IBWA para verificar el cumplimiento de sus normas entre agua embotellada y su calidad bacteriológica (Chaidez, 2002).

La calidad del agua embotellada puede alterarse en cada paso del proceso, desde la producción hasta la distribución a los consumidores. Estos cambios pueden tener su origen en el crecimiento de bacterias sometidas a

condiciones de estrés debido a factores del medio ambiente (temperatura, oxígeno y niveles de nutrientes). Otros puntos críticos donde puede ocurrir la contaminación son el equipo y material usado para el envasado tal como columnas, filtros, botellas y tapaderas (Chaidez, 1999; Chaidez, 2002). En la figura 8, se explica paso a paso como es el proceso de producción de agua embotellada.

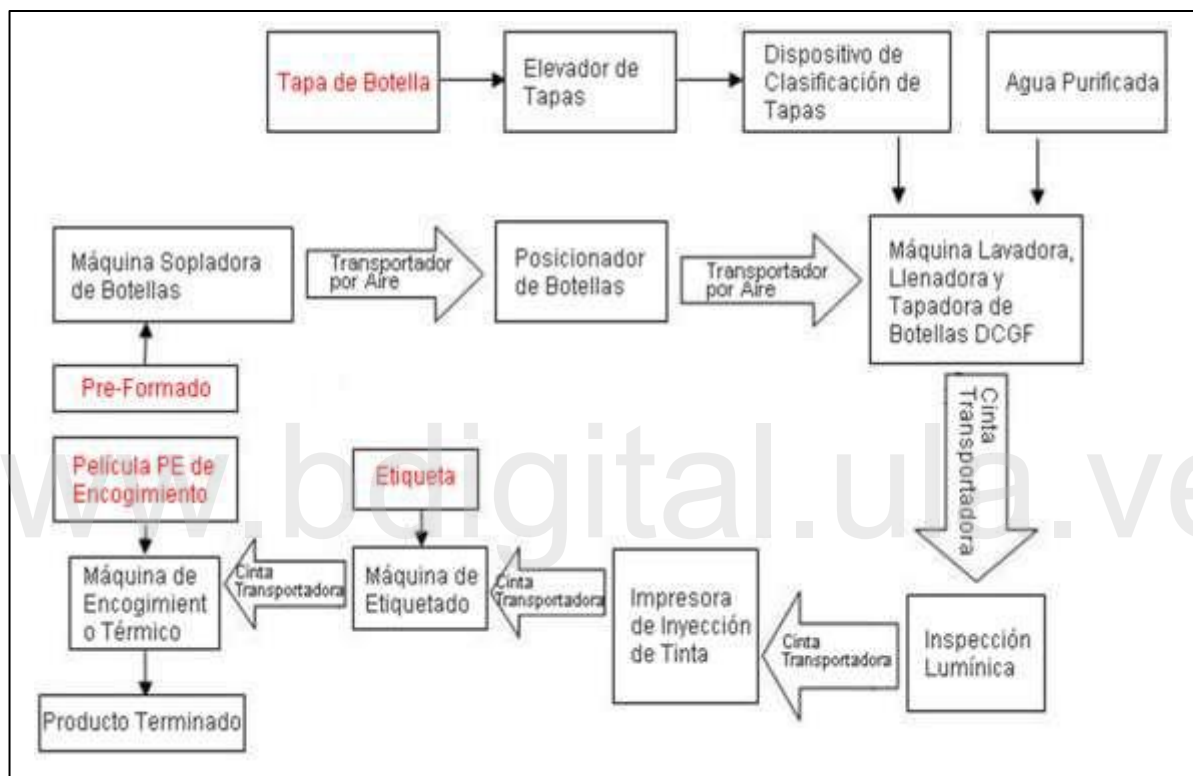


Figura 8. Proceso de producción de agua embotellada

Fuente: Shen Zhen J&D Machinery Co., Ltd. (2006).

Durante el almacenamiento del agua embotellada en bodegas de la fábrica o en supermercados, el crecimiento bacteriano puede aumentar a números mayores de 10^5 UFC/mL. Dicho crecimiento microbiano probablemente se deba a que el tratamiento del envase no es el adecuado, existiendo diversos factores por los cuales puede llegar a contaminarse el recipiente, tales como el manejo inadecuado del personal, una desinfección

inapropiada, o bien almacenamiento prolongado. Aun pequeñas cantidades de bacterias pueden sobrevivir en agua, multiplicarse y afectar la calidad microbiológica de la misma (Bischofberger y col., 1990; Chaidez, 2002; González y col., 1987).

Existe mucha controversia sobre el efecto que pueda tener la microflora del agua para consumo humano. La mayoría de estos organismos no son patogénicos en condiciones normales, pero han sido responsables de infecciones oportunistas en pacientes hospitalizados, siendo los de más alto riesgo aquellos con tratamiento de antibióticos e inmunodeprimidos (Chaidez, 2002; Rusin y col., 1997).

Agua mineral natural

Se conoce como agua mineral a aquellas aguas bacteriológicamente sanas que tienen su origen en un estrato o yacimiento subterráneo, y que brota de un manantial en uno o varios puntos de alumbramiento, naturales o perforados (Iglesias y Martínez, 2006). En la figura 9 se observa como es la obtención del agua mineral natural desde el agua de lluvia hasta el momento en que es envasada.

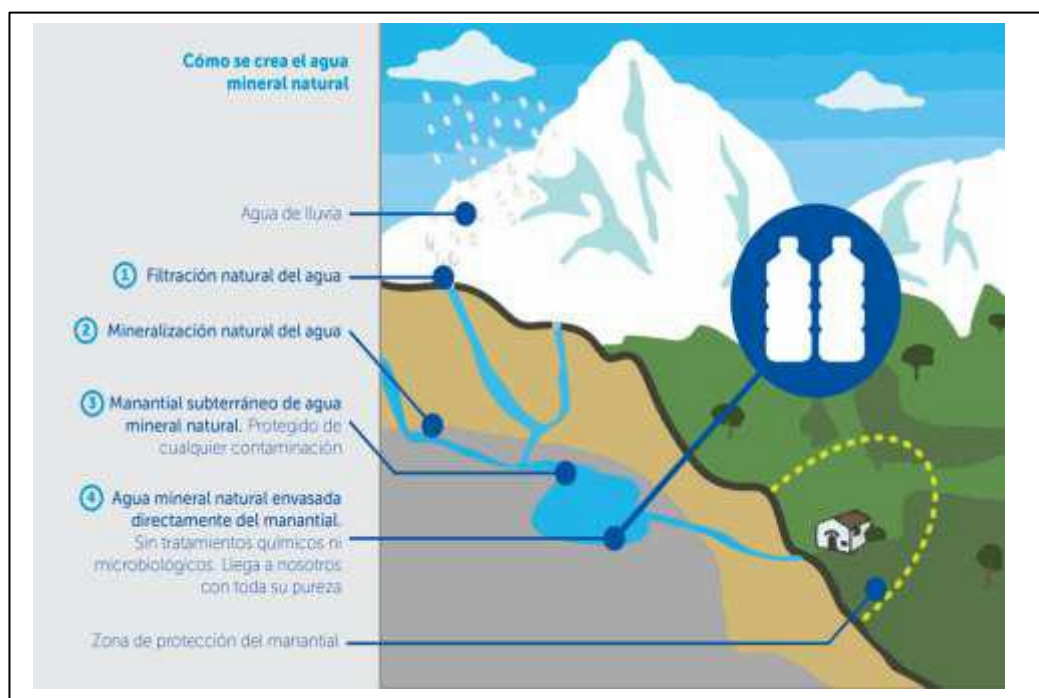


Figura 9. Proceso de formación del agua mineral natural

Fuente: Instituto de Investigación Agua y Salud (2008).

Características microbiológicas de las aguas minerales

Según las directrices generales, para que un agua lleve en la etiqueta la palabra mineral, debe provenir de un manantial o fuente reconocida y no ser tratada, a excepción de la necesaria oxigenación que se realiza luego del filtrado y decantación. El agua que no pretende ser mineral si puede ser tratada, siempre que cumpla con las normas que se rigen para el agua potable (Andueza, 2009).

Las aguas minerales no son estériles y poseen una población microbiana variable y escasa que depende básicamente de sus condiciones fisicoquímicas y ambientales. Las condiciones ecológicas son similares a las de las aguas subterráneas e incluso al agua de mar, ya que todas ellas son aguas oligotróficas, es decir, muy pobres en nutrientes. Pero en la microbiota

de las aguas minerales influyen de manera importante, sus características fisicoquímicas, principalmente la temperatura y la composición en sales por lo que cada agua mineral tendrá una población microbiana típica y distinta (Armijo, 2001; Leclerc y col., 2004; Senior y col., 2005).

Los productores de agua embotellada han tenido la exitosa idea de promover este producto como saludable para el consumo humano y por otro lado, el agua embotellada, ha sido sugerida, por el mercado, como un producto ideal para la preparación de fórmulas de infantes y particularmente para personas inmunosuprimidas. Las personas que pertenecen a este grupo de riesgo, deben consumir agua embotellada, la cual debe estar libre de patógenos para evitar consecuencias potencialmente mortales (Walker, 1992).

Aguas minerales envasadas

La Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN 1982), presenta una clasificación sobre el agua potable envasada que se resume en la tabla 1.

Tabla 1. Clasificación del agua potable envasada

Tipo de Agua	Definición
Agua potable	La procedente directamente o no de fuentes superficiales o profundas que cumplen con los requisitos establecidos y que son aptas para el consumo humano.
Agua mineral	Aquella que procede directamente de aguas de origen profundo o endógeno, que broten naturalmente o se obtengan por perforación y sin contaminación.
Agua mineral natural	Es la misma agua mineral de esta norma pero que no ha sido sometida a tratamiento alguno.
Agua potable gasificada	Es la definida como agua potable de esta norma y deberá contener anhídrido carbónico libre natural o adicionado.
Agua mineral gasificada	Aquella agua mineral que debe contener anhídrido carbónico libre natural o adicionado y establecido según la norma.
Agua envasada	Aquella agua apta para el consumo humano, contenida en recipientes apropiados, aprobados por la autoridad competente y con cierre hermético inviolable, el cual debiendo permanecer en condiciones hasta que llegue a manos del consumidor final. Para ofrecer una mayor garantía de calidad es importante que durante la venta del producto para el consumidor inmediato en cualquier lugar público o privado destaparse en presencia del consumidor.

Fuente: COVENIN, (1982).

Bebidas refrescantes modernas

Constituyen un grupo diverso de productos, estos pueden clasificarse de muchas maneras, por ejemplo, en base a su contenido en azúcar o jugo de frutas, sabor, nivel de carbonato, ingredientes sin agua y funcionalidad. Aparte del agua potable, los tipos más frecuentes de refrescos son los siguientes:

- ✓ Bebidas saborizadas a base de esencias listas para tomar.
- ✓ Bebidas listas para tomar que contengan frutas o zumo de frutas.
- ✓ Bebidas listas para tomar después de diluidas.

Las bebidas funcionales son un subsector en rápido crecimiento del mercado e incluyen bebidas enriquecidas con jugos, vitaminas y minerales, bebidas deportivas y energéticas. Muchas de estas bebidas han sido desarrolladas para proporcionar beneficios médicos o de salud específicos. Su mercado es diverso, y los productos a menudo se adaptan más a los consumidores, por ejemplo, según la edad, el género, para niños, mujeres y adultos mayores (Canadean Beverage Categories Definitions, 2008; Tenge y col., 2001). En la tabla 2 se reflejan las características de estos tipos de refrescos.

Tabla 2. Tipos de refrescos

Tipo de refresco	Descripción
Agua embotellada	Agua potable, agua con sabores minerales y/o vitaminas. (1) Agua al natural: agua de mesa mineral no carbonada, con o sin sabores vitaminas/minerales (2) Agua carbonada: agua mineral o de mesa, aguas bajas en carbón, gasificada naturalmente o por inyección de CO ₂ . (3) Agua saborizada: agua sin azúcar, con esencias y sustancias aromáticas.
Agua caliente	Agua potable vendida en envases de 10 litros o más para usar en dispensadores.
Carbonados	Bebidas endulzadas con dióxido de carbón, sirope para consumo en el hogar y refrescos carbonados para fuera del hogar
Jugo	Jugos 100% de frutas o vegetales sin ingredientes, excepto minerales y vitaminas permitidas con agentes edulcorantes (menos del 2%)
Néctares	Jugo y pulpa de frutas o vegetales diluidos, con agentes edulcorantes, minerales y vitaminas.
Bebidas no carbonadas	Bebidas no carbonadas saborizadas listas para tomar, conteniendo o no sabor a frutas o jugo
Siropes	Productos no listos para tomar vendidos como concentrados para consumo del hogar incluyendo productos y sabores basados en frutas o no.
Frutas en polvo Te frío listo para tomar/café	Productos en forma de polvo no listos para tomar.
	Bebidas a base de té o café y concentrados o líquidos para diluir no listos para tomar.
Bebidas deportivas	Productos descritos como —isotónicoll, —hipertónicoll o —hipotónicoll, carbonadas o natural lista para tomar, bebidas en polvo o concentradas no listas para tomar; también bebidas con sabor o no a frutas.
Bebidas energizantes	Bebidas energizantes principalmente carbonadas que contienen guaraná, glucosa, cafeína, hierbas y sustancias exóticas, minerales y vitaminas.

Fuente: Kregiel (2013)

Agua mineral saborizada

El agua saborizada o agua aromatizada (figura 10) es una bebida no alcohólica, cuyo contenido de agua en fracción de masa es igual o superior al 99,0 %, que se comercializa envasada y sellada, apta para el consumo humano y que cumple con los requisitos de la norma establecida (NTC, 2012).



Figura 10. Diferentes clases de aguas saborizadas

Fuente: Rivera (2009).

La descomposición microbiana de agua mineral con sabor a fruta usualmente se origina durante el proceso de producción. Las materias primas, ambiente de fábrica, el equipo y los paquetes, así como falta de higiene del proceso, son posibles fuentes de contaminación, el deterioro se debe a los procesos metabólicos de las bebidas que se conviertan en indeseables o inaceptables para consumo, debido a cambios en sus características sensoriales (Ju y col., 2009).

Características del agua saborizada

Según la norma técnica de Colombia (NTC, 2012), el agua saborizada se caracteriza por lo siguiente:

- a) El 1,0 % en fracción de masa restante del agua saborizada corresponde a aromatizantes/saborizantes y puede contener ingredientes y aditivos permitidos por el *Codex Alimentarius* y la legislación nacional vigente.
- b) El agua utilizada para la elaboración de este producto debe cumplir con la NTC 3525 o la legislación nacional vigente para agua potable envasada.
- c) Puede o no ser carbonatada (gasificada con dióxido de carbono).

Materias primas del agua saborizada

El agua saborizada contiene sabores artificiales, colorantes y sustancias químicas conservantes, cuyo uso está regulado por requisitos legales y es esencial cumplir con estas normas para evitar daños al consumidor (FAO, 1997).

Por lo general, tanto refrescos como bebidas saborizadas y una enorme lista de alimentos procesados contienen —aditivos alimentarios—. Es decir, sustancias sin valor nutricional que se añaden a los productos en porciones mínimas para modificar algunas de sus características; como, por ejemplo, potenciar el sabor, mejorar su apariencia o, incluso, aumentar su tiempo de vida en anaqueles.

En las bebidas de sabor y en los refrescos podremos encontrar, además de agua, el mayor componente de estos productos, algunos de los siguientes aditivos:

a. Sabor artificial o natural

Son sustancias definidas químicamente, obtenidas por procedimientos físicos microbiológicos o enzimáticos a partir de materias primas de origen vegetal, animal o microbiológico, que se presentan de forma natural o transformada. Dentro de esta clase de sabores se encuentran:

- Sustancias aromatizantes o saborizantes artificiales: Son los compuestos químicos obtenidos por síntesis que no han sido identificados en productos de origen animal o vegetal.
- Sustancias aromatizantes o saborizantes idénticos a los naturales: Son las sustancias químicamente definidas obtenidas por síntesis o las aisladas por procesos químicos a partir de materias primas de origen animal o vegetal, que presentan una estructura química idéntica a la de las sustancias presentes en dichas materias primas naturales procesadas o no (Bonilla y col., 2014).

b. Azúcares y Edulcorantes

Con la excepción de cero calorías, los refrescos y algunas bebidas saborizadas contienen normalmente entre 1% y 12% (p/p) de azúcar. La sacarosa, la glucosa o la fructosa, son utilizadas como edulcorantes naturales. La sacarosa, puede conservar y realzar el sabor de una bebida. La isomaltulosa, como la sacarosa, es un disacárido de glucosa y fructosa, fácil de usar, de bajo índice glucémico, y confiere un dulce ligero el polisacárido D-Tagatose, es casi tan dulce como la sacarosa y tiene propiedades que mejoran el sabor (Ashurst y col., 2009; Hausmann, 2009; Mortensen, 2006).

La mayoría de las bebidas bajas en calorías contienen edulcorantes intensos, que han sido aprobados para su uso dentro de niveles de ingesta diarias aceptables (IDA) y de conformidad con las disposiciones reglamentarias. Los edulcorantes más utilizados son aspartame, acesulfameK, sucralosa y la sacarina. El aspartame es 200 veces más dulce que la sacarosa y no deja ningún regusto desagradable. El acesulfame K es 200 veces más dulce que la sacarosa, estable a los cambios de temperatura y pH (Fitch y col., 2012).

La sucralosa es 600 veces más dulce que la sacarosa, pero no tiene calorías. La sacarina es 300 veces más dulce que la sacarosa pero deja un regusto amargo/metálico (Fitch y col., 2012; Stratford y col., 2003). Otros edulcorantes menos comunes incluyen la taumatina, que es el más poderoso edulcorante, 2000 veces más dulce que el azúcar, se utiliza en los alimentos como edulcorante seguro y modificador de sabor y el esteviósido, otro edulcorante intenso, 200 veces más dulce que sacarosa, extraída de las hojas de la planta de stevia (*Stevia rebaudiana Bertoni*). Otros edulcorantes utilizados más raramente en bebidas incluyen ciclamato, eritritol, y el neotame (Ashurst y col., 2009; Fitch y col., 2012).

c. Aromas y Colorantes

Los aromas y colorantes se utilizan en bebidas para:

- ✓ Hacer productos más atractivos estéticamente.
- ✓ Ayudar a corregir variaciones naturales de color u olor que puedan ocurrir durante el procesamiento o almacenamiento de las bebidas.
- ✓ Contribuyen al mantenimiento de las cualidades por las que se reconoce la bebida.

Existen tres categorías básicas de colorantes: colores naturales, colores artificiales, y caramelos. Los colorantes naturales se pueden extraer de las plantas, frutas y hortalizas y comprenden dos categorías principales:

- a. Carotenoides de color amarillo a naranja, extraídos de las plantas
- b. Antocianinas de color rojo brillante a púrpura obtenidas comercialmente de una gama de frutas y verduras. Los colorantes naturales también se añaden a los refrescos por sus propiedades antioxidantes (Gruenwald, 2009).

Los aromas, en contraste con los colorantes, se utilizan en cantidades comparativamente pequeñas para intensificar el aroma de las bebidas. La legislación de la Unión Europea define los diferentes aromatizantes como naturales, naturales-idénticos y artificiales (EFSA, 2009).

d. Dióxido de Carbono

La carbonatación de los refrescos varía de 1,5 a 5 g/L. El dióxido de carbono es suministrado por los fabricantes de refrescos en forma sólida (como hielo seco) o en forma líquida mantenida a alta presión en contenedores de acero pesado. Este proceso hace que la bebida sea más ácida, contribuyendo a intensificar el sabor y preservar los refrescos durante más tiempo (Korzeniewska y col., 2005; Taylor, 2006).

e. Reguladores de Acidez

Se utilizan en bebidas artificiales para mejorar su sabor equilibrando la dulzura de las mismas. La saliva humana es casi neutra (pH Aproximadamente 6.8), y cuando nuestros receptores gustativos interactúan con ácidos en los alimentos o bebidas esta sensación es percibida como acidez. Los ácidos también juegan un papel importante en la preservación de los refrescos (Chaudhari y col., 2010; Glevitzky y col., 2009).

En la mayoría de las bebidas, el ácido cítrico es el primero en utilizarse como regulador ácido, ya que tiene varios beneficios, como el aumento de la actividad de los antioxidantes y añadiendo aroma. Se utiliza ácido málico cuando se requiere una fuerte mejora del sabor y combinación con ácido cítrico. El ácido fosfórico tiene un fuerte efecto sobre el pH y se utiliza comúnmente para dar un sabor específico a bebidas tipo cola (Taylor, 2006).

f. Conservantes

Esta clase de aditivos sean de origen natural o artificial, se utilizan con el objetivo de prevenir el deterioro que provocan los microorganismos presentes en los alimentos. El ácido cítrico es un buen ejemplo de conservador de origen natural. Los tipos de conservantes químicos que pueden utilizarse dependen las propiedades químicas y físicas tanto del conservante como del pH del producto, la presencia de vitaminas, el envase y las condiciones de almacenamiento.

Los sorbatos y los benzoatos son otra clase de conservantes que se usan en combinación, especialmente en bebidas muy ácidas, específicamente a bebidas industriales tales como refrescos y aguas saborizadas. Su función es retardar el crecimiento de mohos, levaduras y bacterias, estos son conservantes muy eficaces. Suelen utilizarse en combinación con otras sustancias, como el propionato de calcio (Battey y col., 2002).

g. Otros ingredientes

Varios hidrocoloides, tales como guar y goma de algarroba, pectina y xantano, se usan como estabilizadores y espesantes, especialmente en

bebidas dietéticas (para mejorar la sensación en la boca) y bebidas de zumo de frutas (para reducir la separación de fases). Los antioxidantes, más comúnmente ácido ascórbico, se utilizan para evitar el deterioro de los sabores y colores (Gruenwald, 2009).

Tabla 3. Acción química de las materias primas en aguas saborizadas embotelladas

MATERIA PRIMA	ACCIÓN QUÍMICA
Agua Natural	Agua potable para el consumo.
Ácido cítrico	Acidulante, Agente acidificante, Antioxidante, potenciador del sabor, Conservante
Sabor artificial o natural	Correctivo de sabor a fresa, uva, manzana, tamarindo, mandarina y lima-limón
Hexametáfosfato de sodio	Reforzadora de sabor
Vitamina E acetato	Agente solubilizante
Sucralosa	Edulcorante
Citrato de sodio	Regulador de pH
Citrato de potasio	Regulador de pH
Vitamina C	Regulador de pH
Vitamina B3	Energético
Vitamina B5	Energético
Acesulfame K	Edulcorante
Vitamina B6	Energético
Vitamina B12	Energético
EDTA	Agente quelante.
Benzoato de sodio	Agente conservante
Sorbato de potasio	Agente conservante
Propilenglicol	Agente conservante

Fuente: Bonilla y col. (2014).

Parámetros microbiológicos para agua saborizada

Todas las aguas embotelladas deben ser aptas para su bebida y por consiguiente, deben cumplir con una serie de requisitos microbiológicos tales como la ausencia de cualquier microorganismo patógeno (causante de enfermedades). Existen además una serie de microorganismos indicadores que permiten conocer la calidad sanitaria del agua envasada y cuyos límites estándar son establecidos por la legislación de cada país. Es necesario resaltar que algunas aguas embotelladas son sometidas a un tratamiento previo para eliminar cualquier bacteria presente y hacerlas seguras para el consumo (Gunter y col., 2006).

Deterioro microbiano

La multiplicación de microorganismos puede ser causa de que en la bebida gaseosa se forme nata, nebulosidad, sedimento, etc. Las bebidas gaseosas debidamente preparadas no fomentan la multiplicación de bacterias, pues al desarrollo de éstas se oponen el gas carbónico y el ácido del líquido.

La fermentación de bebidas gaseosas es debido a la multiplicación de levaduras, que se alimentan del azúcar y se calcula son la causa del 90% de la inutilización de las bebidas gaseosas. Las poco ácidas o que contiene poco gas o no lo contienen son más susceptibles, pues los ácidos inhiben su desarrollo. Las que se preparan con agua muy alcalina fermentan fácilmente a la causa de la neutralización del ácido (Calderón, 2009).

Tal como se mencionó anteriormente, es posible que exista crecimiento microbiano aún durante el almacenamiento del agua embotellada. Por esta razón para compensar la falta de tecnología en las

grandes empresas en la elaboración de aguas saborizadas, utilizan más azúcar, gas y otros aditivos, mediante los cuales evitan que esa microbiología se desarrolle. Es por esto que se asemejan más a una gaseosa que a un agua saborizada de primera marca (el sabor cambia y tiene otros elementos ya no tan saludables para quien los consume). Las gaseosas son más robustas desde el punto de vista del producto, no se contaminan, no le crecen levaduras, porque tienen más gas. Las —aguas saborizadasll, al contener también azúcar (a un nivel mucho menor que las gaseosas), necesitan indefectiblemente una estricta limpieza de sus líneas de producción, ya que de no estarlo crecerán hongos, levaduras y microorganismos, y el producto ya no serviría (Alonso, 2016).

Envases

La contaminación microbiana de los refrescos suele originarse durante el proceso de producción, la materia prima, el ambiente de la fábrica, estado microbiológico del equipo y de los paquetes, y la falta de higiene son todos los factores posibles. Los materiales de envasado como latas y botellas también pueden ser fuentes de contaminación (Stratford y col., 2006; Park y col., 2009).

El tipo de envases utilizados, tales como latas y botellas, también pueden afectar el desarrollo de la microflora, pueden influir en el número y el tipo de células que crecen y se adhieren a la superficie de la botella, la capacidad de las células que se adhieran y se acumulen en los materiales de embalaje puede exacerbar la contaminación de la bebida, reduciendo su calidad y seguridad microbiológica (Horsakov y col., 2009; Sedla'chov y col., 2011).

Los materiales de embalaje varían en términos de permeabilidad al oxígeno. El vidrio es aún el material de embalaje preferido para fruta de alta

calidad en bebidas, aunque el proceso de llenado en caliente-espera-enfriamiento debe ser aplicado con cuidado, para evitar la rotura del contenedor. El crecimiento de las bacterias también mejora significativamente con la superficie interna de las botellas (el llamado efecto botella). El poliestireno (PS) es uno de los materiales plásticos más utilizados comúnmente en recipientes, tapas y botellas, es barato, flexible, duradero y químicamente resistente (Ahmad y col., 2007; Kokare y col., 2007; Wegelin y col., 2001).

Parámetros Fisicoquímicos

Sabor y Olor

Se aplica por contaminantes del agua potable que afectan de forma negativa a las cualidades estéticas del agua, como el olor y apariencia. No se conocen efectos adversos para la salud y por tanto estas normas secundarias no son obligatorias. Sin embargo la mayor parte de los sistemas de agua cumplen con los límites (Answers Corporation, 2014)

El olor y sabor no son por lo común un problema hasta que saltan las quejas del consumidor. Por experiencia de los especialistas del agua potable han aprendido los inconvenientes de olor y sabor son la primera señal de alarma de un posible riesgo a la salud. La queja mayoritaria del consumidor de agua es el sabor a cloro, cuando el umbral del olor es algunas veces de tan solo de 0,2 a 0,4 mg/L, a un nivel normal de pH. En general, los contaminantes del agua son atribuibles a la naturaleza o al uso humano. El sabor y olor en el agua se deben a una gran variedad de sustancias, como son los minerales, metales y sales del suelo, los constituyentes de aguas residuales y los productos finales de las reacciones biológicas (APHA 1992).

El Sabor es una prueba organoléptica la cual se utiliza el sentido del gusto, el sabor abarca un complejo de sensaciones olfativas, gustativas y táctiles, originadas por el estímulo de terminaciones nerviosas situadas en la lengua y en la cavidad nasal y bucal. Fisiológicamente, los sentidos del gusto y el olfato están íntimamente relacionados ya que las papilas linguales y las olfativas detectan estímulos simultáneos y complementarios. Prueba organoléptica, el agua es un medio neutro, en su forma pura el agua no produce sensaciones olfativas y gustativas. Estos sentidos proporcionan el primer aviso de riesgos ambientales (si existe mal olor o un color no característico al agua ya sea turbidez o coloración) (Carvajal, 1998).

Temperatura

El agua posee muchas cualidades térmicas importantes. La temperatura del agua cambia gradualmente como consecuencia de cambios estacionales. La temperatura del aire circulante influirá más en las masas pequeñas de agua, que en las grandes. Un abastecimiento ideal de agua tendrá, en todo momento, una temperatura casi constante o una variación de temperatura mínima. Las condiciones reales, no siempre son las recomendadas. La contaminación térmica se cita a menudo como causa de grandes variaciones en los suministros de agua (Answers Corporation, 2014).

La temperatura no se utiliza normalmente para evaluar el agua más allá de la preferencia de la mayor parte de las personas por el agua de bebida fría; la temperatura tiene poca importancia directa en los suministros públicos de agua. Las variaciones de temperatura afectan a la solubilidad de sales y gases en agua y en general a todas sus propiedades, tanto químicas como a su comportamiento microbiológico. La medida de la temperatura de un agua es un método muy simple y sólo requiere la inmersión de un

termómetro convencional o electrónico en el fluido, un tiempo corto (generalmente, menos de 1 minuto) hasta lograr el equilibrio térmico. Debe efectuarse en el momento de la toma de muestra (Answers Corporation, 2014).

pH

Aunque el pH no suele afectar directamente a los consumidores, es uno de los parámetros operativos más importantes de la calidad del agua. Se debe prestar mucha atención al control del pH en todas las fases del tratamiento del agua para garantizar que su clarificación y desinfección sean satisfactorias. Para que la desinfección con cloro sea eficaz, es preferible que el pH sea menor que 8; no obstante, el agua con un pH más bajo será probablemente corrosiva. Si no se reduce al mínimo, la corrosión puede provocar la contaminación del agua de consumo y efectos adversos en su sabor y aspecto. El pH óptimo necesario variará en distintos sistemas de abastecimiento en función de la composición del agua y la naturaleza de los materiales empleados en el sistema de distribución, pero suele oscilar entre 6,5 y 8 (OMS, 2006).

Método de la Membrana Filtrante

Según el Comité Venezolano de Normas Industriales (COVENIN, 2409-86), el método consiste en filtrar un volumen determinado de una muestra representativa del agua a ser analizada, a través de una membrana filtrante de porosidad adecuada. Después de la filtración se coloca la membrana en un medio de cultivo apropiado, luego se incuba y al finalizar el periodo de incubación, se cuentan las colonias características del microorganismo en estudio (COVENIN, 1986). En el siguiente apartado se

describe en detalle la constitución del equipo de filtración utilizado para efectuar el mencionado procedimiento.

Equipo de filtración

1. Unidad de filtración: consta de un embudo receptor y un portafiltro, esterilizables con o sin pinza sujetadora
2. Matraz kitasato
3. Bomba de vacío
4. Filtros de membrana: deben ser planos, circulares, reticulados, con un diámetro de 47mm, un espesor uniforme, esterilizables, fabricados a partir de una mezcla pura y biológicamente inerte de derivados de celulosa, libre de sustancias químicas que inhiban el desarrollo de los microorganismos, que tengan una velocidad de filtración satisfactoria, que no influyan significativamente sobre el pH del medio y que permita el paso de nutrientes desde el medio de cultivo, en forma ascendente (COVENIN,1986).

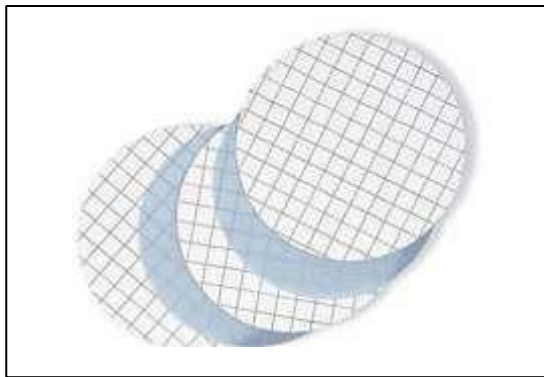


Figura 11. Membranas de filtración Millipore®

Fuente: Vargas y García (2017).



Figura 12. Equipo de filtración utilizado para el procesamiento de las muestras
Fuente: Vargas y García (2017).

Ventajas del uso del método de membrana filtrante

- ✓ Rapidez en la obtención de resultados.
- ✓ Ahorro de mano de obra, medios, material de vidrio y costo de los materiales si el filtro se lava y se vuelve a utilizar.
- ✓ La muestra puede filtrarse *in situ* si se pone el filtro en un medio de transporte y se envía por correo al laboratorio, evitando así retrasos en la recepción de la muestra.
- ✓ Pueden exponerse los organismos a medios de enriquecimiento muy fácilmente durante un corto tiempo y una temperatura conveniente (Collins, 1990).

Limitaciones del método de membrana filtrante

- ✓ Las muestras que contengan un alto número de bacterias no coliformes, capaces de crecer en un medio de cultivo como el Endo, presentan las siguientes dificultades.
- ✓ La alta concentración de bacterias no coliformes puede inhibir la producción del brillo verde metálico característico de las bacterias coliformes o incluso suprimir el crecimiento de las mismas.
- ✓ En muestras con un recuento bajo de coliformes pero con un gran contenido de sólidos suspendidos, las colonias bacterianas pueden crecer como una película continua en la superficie de la membrana impidiendo de esta manera el desarrollo del brillo verde metálico característico de los coliformes.
- ✓ En algunas muestras que contengan cantidades de hasta 1mg/L de cobre o zinc o ambos, se obtienen recuentos irregulares de bacterias coliformes.
- ✓ Ocasionalmente, algunas cepas bacterianas que presentan crecimiento con el método de membrana, con producción de brillo metálico; al ser confirmadas según la Norma Venezolana COVENIN1104, presentan producción de ácido sin gas, lo cual es un indicador falso de la población real de coliformes presentes en la muestra. En caso de encontrarse estas limitaciones no debe usarse el método de membrana filtrante sino el método de tubos múltiples de dilución (NMP) (COVENIN 1986).

Preparación y conservación de las muestras

La muestra a ensayar consiste en una muestra representativa del agua a analizar (100mL), bien homogeneizada.

Definición Operacional de Términos

Agua mineral natural: Es agua de origen subterráneo que brota a la superficie en uno o varios puntos naturales o perforados. Microbiológicamente sana, envasada en la fuente de origen, rica en sales minerales lo que le confiere propiedades saludables (Cruz, 2015).

Calidad Sanitaria: Conjunto de condiciones higiénico- sanitarias necesarias para que un producto no afecte negativamente a la salud del consumidor (Ramos, 2009).

Cepa: Es una población de células de una sola especie descendientes de una única célula, usualmente propagada clonalmente, debido al interés en la conservación de sus cualidades definitorias. De una manera más básica puede definirse como un conjunto de especies bacterianas que comparten, al menos, una característica (Madigan y col., 2009).

Coliformes: bacilos gran negativos, no esporulados, oxidasa negativos, aerobios o anaerobios facultativos, que pueden multiplicarse en presencia de sales biliares y que son capaces de fermentar la lactosa, con producción de ácido y de gas en cuarenta y ocho horas a una temperatura de 35°C a 37°C. Las especies son *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae* y *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter fecundii*, *Citrobacter diversus* y *Citrobacter amalonatica* (Larrañaga y col. 1999).

Colonia: Es una masa visible de células microbianas que se originan a partir de una célula o de un grupo de los mismos microorganismos (Tortora y col. 2007).

Levadura: Son hongos microscópicos unicelulares que son importantes por su capacidad para realizar la fermentación de hidratos de carbono, produciendo distintas sustancias (Bermudez, 2007).

Moho: El termino moho se suele utilizar para designar el desarrollo de hongos de color negro, azul, verde y rojo en una superficie (Bermudez, 2007).

Potabilización: Conjunto de operaciones y procesos, físicos y/o químicos que se aplican al agua a fin de mejorar su calidad y hacerla apta para uso y consumo humano (Norma Oficial Mexicana, 1994).

www.bdigital.ula.ve

Operacionalización del Evento de Estudio

Proceso mediante el cual se transforma la variable de conceptos abstractos a términos concretos observables y medibles, es decir, dimensiones e indicadores (Fidias, 2004).

Tabla 4. Operacionalización del Evento de Estudio

Variable	Definición Conceptual	Definición Operacional	Dimensiones	Indicador
Calidad sanitaria de las aguas envasadas saborizadas expendidas en un Automercad o del municipio Libertador del estado Mérida	La calidad del agua de consumo humano estriba en que sea salubre y limpia. Y lo será cuando no contenga ningún tipo de microorganismo, parásito o sustancia, en tal cantidad que pueda implicar un riesgo para la salud humana y cumpla con las determinaciones de la norma en su composición microbiológica y química.	La calidad microbiológica de las aguas saborizadas se determinará mediante análisis microbiológicos.	Tipo de microorganismos	-Bacterias Aerobias Mesófilas -Coliformes Totales -Coliformes Fecales - <i>Pseudomonas aeruginosa</i> -Mohos y Levaduras
			Control sanitario	-Adecuado -Inadecuado

Fuente: Vargas y García (2017).

HIPÓTESIS

Las aguas minerales envasadas saborizadas que se expenden en un Automercado del municipio Libertador del estado Mérida presentan una calidad sanitaria adecuada y no representan un riesgo para la salud de los consumidores.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

Tipo de Investigación

La presente investigación es de tipo descriptivo debido a que su objetivo central es lograr la descripción o caracterización de un evento de estudio dentro de un contexto particular (Hurtado, 2010). En este estudio en particular, se analizó la calidad sanitaria de las aguas minerales saborizadas expendidas en un Automercado del Municipio Libertador del Estado Mérida.

Diseño de la Investigación

El diseño de investigación está relacionado con el cómo y dónde se recolectaran los datos del evento de estudio. Para Fidias (2004), es la estrategia general que adopta el investigador para responder al problema planteado. En el presente estudio el diseño de investigación, es un diseño no experimental ya que el investigador no altera ni manipula los resultados. Esta investigación solo se limita a observar los acontecimientos sin intervenir en los mismos. A su vez es una investigación transeccional descriptiva debido a que solo recolecta datos en un momento y tiempo único y pretende conocer la calidad sanitaria de las aguas minerales saborizadas expendidas en un Automercado del estado Mérida en un momento único en particular.

Población y Muestra

Ubicación Geográfica de la zona a estudiar

El espacio seleccionado para este estudio es un Automercado, ubicado en avenida Las Américas, en el municipio Libertador del estado Mérida, en Venezuela. Las coordenadas geográficas del sitio de estudio son Latitud Norte: 7°35'39" Longitud Oeste: 71° 32'15" y la altitud del lugar es de 1456 m.s.n.m.

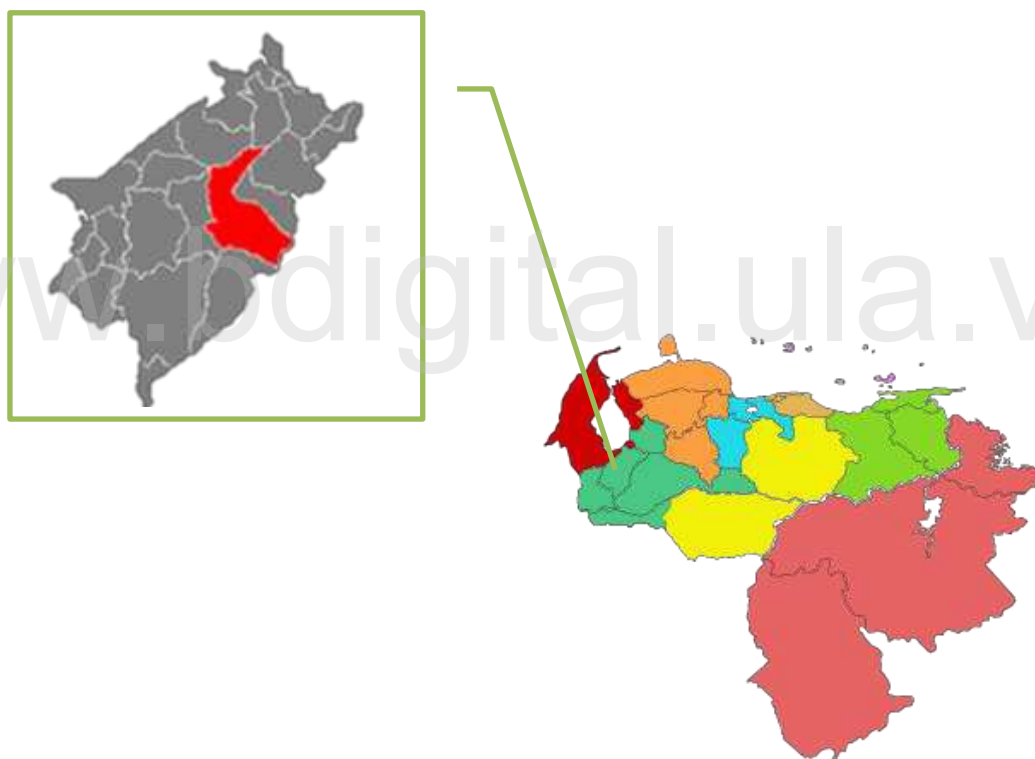


Figura 13. Mapa del municipio Libertador del estado Mérida

Fuente: Instituto Nacional de Estadística (2015); González (2009), modificada por Vargas y García (2017).

Población

Estuvo representada por el total de aguas minerales envasadas saborizadas de una marca en particular (N= 12) que se expenden en un Automercado del municipio Libertador del estado Mérida.

Selección del Tamaño de la muestra

Se tomaron cuatro muestras al azar $n=4$ (33,33%) de un total de $N=12$ (100%) que cumplieran con los siguientes criterios de inclusión: la muestra debe estar conservada en envases de plástico, de 600 cm³ de capacidad y debería estar almacenada en la nevera bajo condiciones de refrigeración.

Recolección de las Muestras

Las muestras fueron recolectadas en un Automercado del Municipio Libertador del Estado Mérida, al momento de su recolección la temperatura era de 4°C. Una vez recolectadas las muestras (100%) agua mineral natural y aguas minerales saborizadas, se transportaron en una cava con hielo al laboratorio de Microbiología de los Alimentos y Aguas de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis y posteriormente se mantuvieron almacenadas en una nevera a 4°C hasta el momento de su procesamiento en el laboratorio.

En la siguiente tabla se describen las características de las muestras recolectadas, teniendo en cuenta que todas las aguas son de una misma marca, de 600 mL de capacidad y su envase es de plástico.

Tabla 5. Identificación de las muestras seleccionadas para el estudio

Muestra	Sabor	Composición nutricional	Colorantes
1	Natural	Energía 0kcal Grasas 0g Carbohidratos 0g Proteínas 0g	Ninguno
2	Toronja	Energía 0kcal Grasas 0g Carbohidratos 0g Proteínas 0g Sodio 22mg	Amarillo # 6 Rojo # 40
3	Mandarina		Amarillo # 6
4	Jamaica		Rojo # 40 Amarillo #5 Azul # 1

Fuente: Vargas y García (2017).

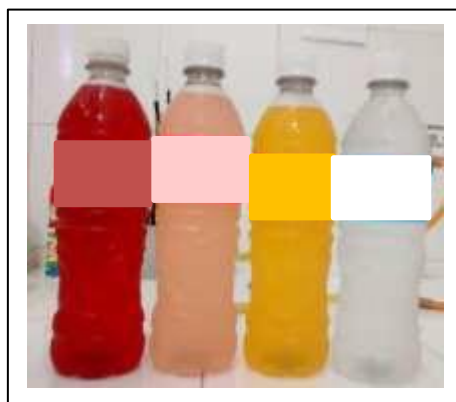


Figura 14. Muestras recolectadas

Fuente: Vargas y García (2017).

Procedimientos de la Investigación

MATERIALES

Es conveniente recordar que para la realización de la parte experimental son necesarios una serie de materiales y equipos que fueron utilizados para el procesamiento de las muestras y obtención de resultados los mismos se describen en la tabla 6.

Tabla 6. Materiales utilizados para el procesamiento de las muestras y obtención de resultados

<i>Material de Vidrio</i>	<i>Equipos</i>	<i>Otros</i>
Capsulas de Petri	Autoclave	Guantes
Vasos precipitados	Equipo de filtración	Termómetro
Pipetas Serológicas de 1mL	Bomba de vacío	Agua destilada
Varilla de vidrio	Cuentacolonias	Cintas de pH
Varilla acodada	Estufa	Tapaboca
Fiolas para la preparación de los medios de cultivo	Refrigerador	Membranas filtrantes estériles Millipore® de 0,45 micrómetros de diámetro
Matraz kitasato	Unidad de filtración	Ácido Clorhídrico 0,1N
Envases de vidrio con tapa		Mecheros
		Pinzas estériles
		Balanza

Fuente: Vargas y García (2017).

Medios de cultivo comerciales deshidratados

- **Agar Cetrimide** (HI-MEDIA)[®] para el aislamiento selectivo de *Pseudomonas aeruginosa* de muestras clínicas.
- **Agar Plate Count** (agar de métodos estándar) (HI-MEDIA)[®] para la determinación del recuento de microorganismos en alimentos, agua, aguas residuales y muestras clínicas.
- **Agar Eosina azul de metileno (E.A.M)** (HI-MEDIA)[®] utilizado para el aislamiento selectivo de bacilos Gram negativos de rápido desarrollo y escasas exigencias nutricionales. Permite el desarrollo de todas las especies de la familia Enterobacteriaceae.
- **Agar Sabraud Dextrosa** (OXOID)[®] medio de cultivo que por sus características funciona como medio de enriquecimiento para hongos.
- **Agar Agua Peptonada** (MERCK)[®] usado como diluyente y para enriquecimiento bacteriano a partir de alimentos y otros materiales de interés sanitario.

Los medios de cultivo utilizados se prepararon a partir de las formas deshidratadas suministradas por las casas comerciales o mezclando los constituyentes del medio, de acuerdo a la fórmula correspondiente. Se reconstituyeron con agua destilada y posteriormente se esterilizaron en autoclave a 121° C y 5 Lb de presión durante 15 minutos.

Metodología

1. Procesamiento de las muestras de agua saborizada

Para el procesamiento de las muestras de agua saborizada se utilizó el método oficial para análisis microbiológico de las aguas, conocido como el

método de la membrana filtrante (COVENIN 2409-86), de la siguiente manera:

- ✓ Con una pinza esterilizada por flameo, se colocó la membrana sobre la rejilla del portafiltro (con el lado cuadrículado hacia arriba).
- ✓ Se colocó con mucho cuidado el embudo.
- ✓ Se agregaron 100 mL de la muestra de agua (este paso se realizó para el agua saborizada sabor a mandarina y para una muestra de agua mineral natural) en el embudo y por medio de un vacío parcial creado por la bomba de vacío, se procedió al filtrado de la muestra.
- ✓ Una vez terminada la filtración de la muestra, se lavó el embudo con aproximadamente 100mL de agar agua peptonada estéril.
- ✓ Se removió la parte superior del portafiltro y con una pinza esterilizada por flameo, se transportó la membrana a la capsula de Petri que contenía el medio de cultivo correspondiente al microorganismo que se iba a identificar. La membrana debió ser colocada lentamente para evitar la formación de burbujas de aire entre el medio de cultivo y la membrana, comenzando por el extremo opuesto de la pinza.
- ✓ Una vez colocada la membrana en la placa de Petri, se esperó aproximadamente 20 min para permitir la adhesión de la membrana al medio, luego se invirtió e incubó.
- ✓ Paralelamente, se efectuó un ensayo en blanco sin la muestra, utilizando solución de agar agua peptonada estéril en lugar de la muestra.
- ✓ Al final de la incubación se seleccionaron aquellas placas que contenían colonias características según el recuento en proceso. Se contaron el número de colonias que se desarrollaron y se calculó el número de bacterias viables.

2. Determinación de indicadores de calidad sanitaria

2.1 Recuento de Bacterias Aerobias Mesófilas

Para la detección de Bacterias Aerobias Mesófilas se utilizó Agar Plate Count previamente fundido y temperado a 45-50°C. Se mezcló por rotación suave y se dejó solidificar sobre una superficie plana. Una vez solidificado el agar se procedió a realizar la filtración del agua mineral y agua saborizada, como se indica en la norma COVENIN (2409-86). Seguidamente se sembró la membrana millipore® (teniendo cuidado de no formar burbujas entre el medio y la membrana sobre el agar) y se incubó a 37°C por 48 a 72 horas. Finalizado el tiempo de incubación se contaron las colonias de aspecto característico presentes (pequeñas, con bordes definidos, de color crema) y el resultado se expresó en UFC por 100 mL de agua (UFC/100 mL).

2.2 Recuento de Coliformes Totales y Fecales

En la determinación de coliformes totales y fecales se utilizó agar eosina azul de metileno. Una vez que la muestra fue filtrada y pre-enriquecida con 100mL de agua peptonada, se procedió a sembrar la membrana millipore® evitando formar burbujas entre el medio y la membrana sobre el agar. Se incubaron a 37°C por 48 horas la mitad de las placas sembradas para detectar coliformes totales, y la otra mitad se incubó a 44,5°C por 24 horas para detectar coliformes fecales. Finalizado el tiempo de incubación se contaron las colonias características de coliformes, como aquellas de pequeño tamaño, con un punto negro centrado, con presencia o ausencia de brillo verde metálico, y el resultado se expresó en UFC por 100 mL de agua.

2.3 Determinación de *Pseudomonas aeruginosa*

El aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa* se realizó por la técnica de filtración de membrana tal como se indica en la norma COVENIN 2409-86. Se colocaron 100mL de la muestra en el equipo de filtración, seguidamente se realizó un lavado con agua peptonada estéril, finalizada la filtración se colocó la membrana millipore® en el centro de la placa con agar cetrimide, y se incubó a 37° C durante 24 horas. Se consideraron como colonias características de *Pseudomonas aeruginosa*, aquellas que presentaran tamaño pequeño y pigmento verde azulado alrededor.

2.4 Determinación de Mohos y Levaduras

Se realizó por la técnica de filtración de membrana, para esto, se añadieron 100mL de la muestra, luego se puso en marcha el sistema de vacío. Una vez filtrada toda la muestra, se realizó un lavado con 100mL de agua peptonada estéril. Se detuvo la bomba de vacío y se separó el embudo de la base del filtro retirando con pinza estéril la membrana filtrante, la cual fue colocada en una placa de petri preparada previamente con aproximadamente 10 mL de agar Sabouraud Dextrosa solidificado. Finalmente se incubaron las placas a temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) por 7 días. Finalizado el tiempo de incubación se procedió al recuento de colonias características, expresando el resultado en UFC/100 mL. Las levaduras son colonias pequeñas con bordes definidos, varían de color rosa-tostado a azul-verdoso y pueden aparecer alzadas. Los mohos son colonias grandes, con bordes difusos, de color variable mayormente negruzcos las colonias son planas y generalmente con un foco en el centro de la colonia.

3. Determinación de parámetros fisicoquímicos

3.1 Determinación de pH

Se realizó la determinación del pH de las muestras con una tira de papel indicador de pH, para esto se añadieron en un vaso de precipitado 20 mL de la muestra, se introdujo una porción de la tira de pH y se procedió a realizar la lectura en comparación con la escala de pH suministrada por el fabricante.

3.2 Determinación de Temperatura

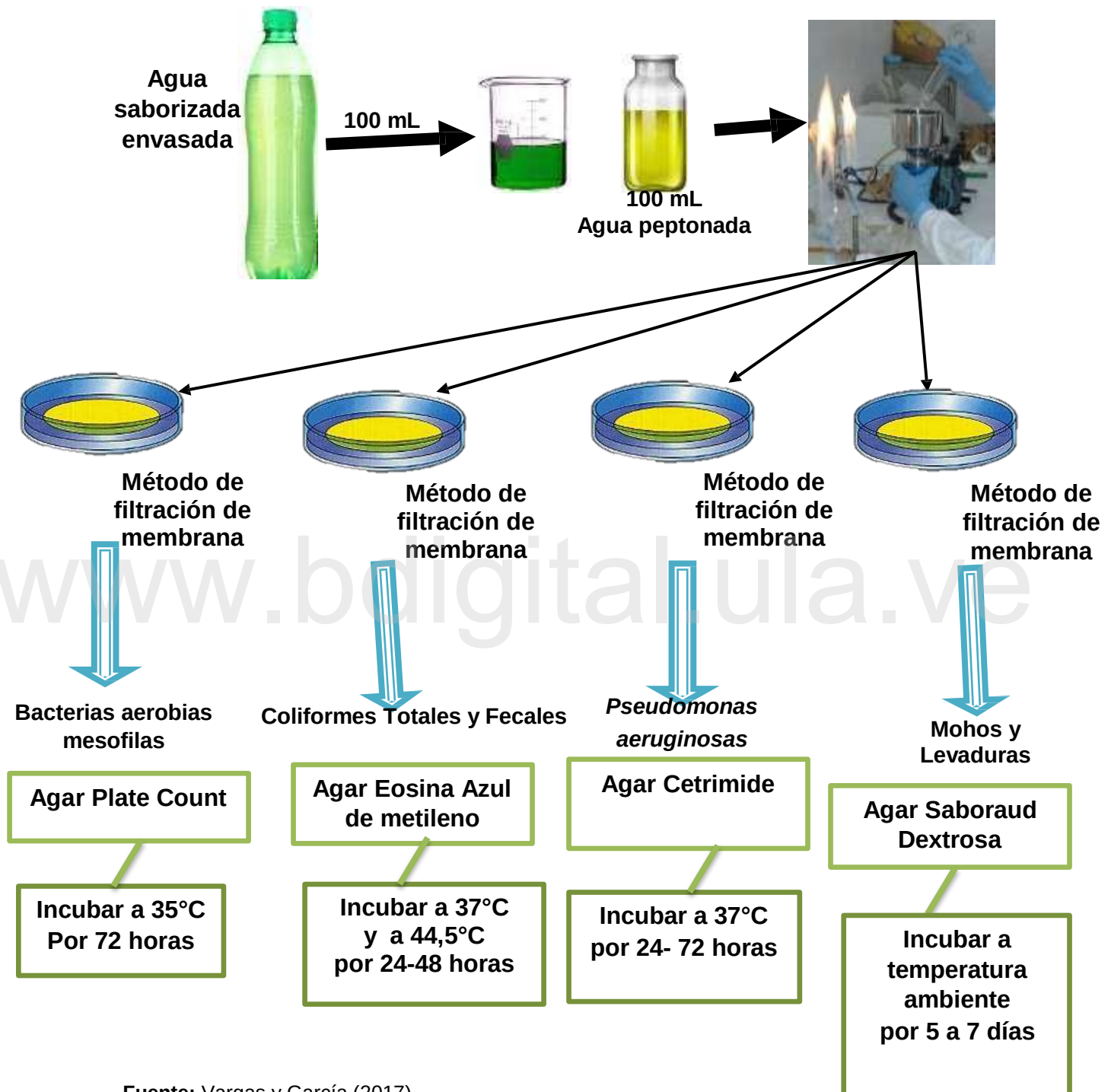
Para medir la temperatura de cada muestra de agua saborizada, se añadieron 20 mL de muestra en un vaso precipitado y con ayuda de un termómetro de mercurio se realizó la lectura.

Diseño de Análisis

Se determinaron la media ($\bar{x}$), desviación estándar (DE), valor máximo y valor mínimo de los datos obtenidos en relación al crecimiento de colonias, utilizando el programa Excel 2010 de Microsoft®.

www.bdigital.ula.ve

DISEÑO EXPERIMENTAL



CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El consumo de agua mineral envasada es popular en la mayoría de los países incluyendo Venezuela, debido a la creencia de que su calidad es superior al agua de grifo y no contiene microorganismos, además de no presentar sabores y olores desagradables. De hecho, la ausencia de cloro residual y su sabor característico es una de las estrategias promocionales que utilizan las industrias envasadoras (Iriarte, 2009).

Todas las aguas embotelladas deben ser seguras para su bebida y por consiguiente, deben encontrarse exentas de cualquier microorganismo patógeno, razón por la cual se someten a tratamientos químicos para eliminar cualquier microorganismo que pudiese representar un riesgo para la salud, y hacerlas seguras para su consumo (Senior, 2001).

En la presente investigación se analizó la calidad de las aguas minerales saborizadas que se expenden en un Automercado del Municipio Libertador del Estado Mérida, encontrándose en las muestras analizadas, crecimiento de Bacterias Aerobias Mesófilas y presencia de mohos, demostrándose de esta manera que este tipo de productos no se encuentran libres de microorganismos y de ahí la importancia de realizar análisis microbiológicos que garanticen una adecuada calidad para su consumo.

En este sentido, el recuento de Bacterias Aerobias Mesófilas es importante porque permite evaluar la calidad microbiológica y las prácticas de manufactura que estén implementando las empresas procesadoras del agua envasada, cuyo producto final debe cumplir con el límite establecido por la norma COVENIN 1431-82 para Agua Potable Envasada, cuyo valor para aerobios mesófilos deber ser $<100\text{UFC/mL}$. Este recuento provee un

estimado del número total de bacterias viables y da información acerca de la calidad sanitaria del agua, además permite juzgar la eficiencia de los tratamientos químicos empleados o la recontaminación de las botellas de agua mineral por flora bacteriana (Spino, 1985; Rheinheimer, 1987; Rodier y col., 1990).

En la tabla 7 se resumen los valores obtenidos en la presente investigación respecto a la determinación de Bacterias Aerobias Mesófilas en las muestras de agua mineral analizada:

Tabla 7. Cuantificación del número de Bacterias Aerobias Mesófilas en las muestras de agua mineral y aguas minerales saborizadas analizadas

Muestra	Límite permitido COVENIN (1431-82)	BAM UFC/100mL	Frecuencia	Porcentaje (%)
1	<100 UFC/100mL	$\leq 1 \times 10$	1	25
2		$\leq 1 \times 10$	1	25
3		6×10	1	25
4		$\leq 1 \times 10$	1	25
Total		-	-	100

Fuente: Vargas y García (2017).

Tal como se observa en la tabla anterior, se evidenció crecimiento de Bacterias Aerobias Mesófilas únicamente en la muestra de agua mineral saborizada de mandarina, igual a 6×10 UFC/100mL. Al comparar este resultado con las Normas COVENIN 1431-82 para agua potable, se observó que las muestras analizadas cumplen con las medidas exigidas por la norma en cuanto a este indicador de calidad sanitaria.

Por otra parte, al comparar dicho resultado con las normas Oficiales para la Calidad del Agua Argentina se observa que el recuento máximo

permitido para Bacterias Mesófilas es de 500 UFC/mL, siendo este número mayor que el valor reportado en nuestra investigación. Por tal motivo se podría señalar que las aguas minerales saborizadas estudiadas cumplen con este requisito inclusive en comparación con las normativas de calidad argentinas.

De manera similar, Martínez y Pérez (2010), en el laboratorio bacteriológico de aguas de la Universidad de Oriente, núcleo Bolívar, analizaron cinco marcas de agua mineral envasada, obteniendo como resultado del conteo de Bacterias Aerobias Mesófilas un valor de 11 UFC/mL. Por lo tanto concluyeron que el agua potable envasada comercialmente para el período evaluado resultó apta para el consumo humano. Dichos resultados coinciden con los encontrados en el presente estudio ya que se considera que las aguas saborizadas analizadas resultan aptas para ser consumidas.

Por otra parte, Dugarte y Rojas (2012), efectuaron un estudio sobre la microbiota bacteriana heterótrofa de aguas minerales envasadas, de consumo en los Municipios Libertador y Campo Elías del estado Mérida, evidenciando la presencia de Bacterias Aerobias Mesófilas en el 90,90% de las muestras analizadas. No obstante, a pesar de la elevada frecuencia de aparición en las muestras, los investigadores afirmaron que las bacterias heterotróficas por sí mismas no representan ningún riesgo para los consumidores. Los recuentos altos en un sistema de distribución pueden representar una contaminación o algún otro problema de calidad del agua; sin embargo, esto no puede relacionarse cuantitativamente a un riesgo de enfermedad en particular (Rusin y col., 1997).

A diferencia de las investigaciones anteriores, Benítez y col. (2013), analizaron diez marcas de agua mineral envasadas en bolsas y botellas comercializadas en la ciudad de Maracaibo. Dichos investigadores obtuvieron como resultado que la mitad de las aguas analizadas, arrojaron

valores promedio de aerobios mesófilos que exceden los estándares establecidos por la Norma Oficial venezolana para estos microorganismos en aguas envasadas de consumo humano.

En este sentido, es pertinente resaltar que dos de las marcas que analizaron dichos autores presentaron contajes muy altos (270 UFC/mL y 277 UFC/mL), por encima del valor permitido por la norma COVENIN (<100 UFC/mL), mientras que una de las marcas de agua envasada evidenció un contaje mínimo de aerobios mesófilos igual a 5,0 UFC/mL, valor similar al recuento de aerobios mesófilos obtenido en la muestra de agua saborizada de mandarina, analizada en el presente trabajo.

Otro estudio realizado por Vidal y col. (2009), en diferentes marcas de agua mineral provenientes de Sincelejo, Colombia, dio como resultado que el 92% de las marcas estudiadas mostraron crecimiento de Bacterias Aerobias Mesófilas. Este elevado porcentaje de marcas que presentaron estos microorganismos en sus productos, indica que probablemente en la elaboración del agua envasada en las empresas locales, están fallando los procesos de higiene y manipulación de la bebida. Asimismo, el desarrollo de aerobios mesófilos en botellas y bolsas plásticas puede estar relacionado al grado de limpieza e integridad del sistema de distribución. Como se mencionó anteriormente, dicho crecimiento determina si el agua es adecuada o no para consumo humano, indicando además, las condiciones higiénicas de la materia prima, la forma como fueron manipuladas, el procesamiento, empaque, distribución, entre otros (Vilanova, 2004).

En relación a los resultados de Coliformes totales y Coliformes fecales en las muestras de agua saborizada analizadas en este trabajo de investigación, tal como se refleja en la tabla 8, se evidenció que las mismas no presentaron crecimiento alguno de estos microorganismos finalizado el tiempo de incubación. La Norma COVENIN 1431-82 para Agua Potable Envasada establece un límite permisible de coliformes totales que va desde 0 hasta 10

UFC/mL, de modo que al comparar los resultados obtenidos con dicha Norma, se puede afirmar que las muestras de agua saborizada analizadas cumplen con las especificaciones establecidas y por tanto no representan un riesgo para la salud de los consumidores.

Cabe destacar, que la contaminación fecal del agua potable puede incorporar una variedad de patógenos intestinales de tipo bacteriano cuya presencia está relacionada con enfermedades que pueden ir desde una ligera gastroenteritis hasta casos graves y a veces fatales de disentería, cólera o fiebre tifoidea (Mossel, 1976; Payment, P. 1994; Payment y col., 1991).

Tabla 8. Cuantificación del número de Coliformes Totales y Coliformes Fecales en las muestras de agua mineral y aguas minerales saborizadas analizadas

Muestra	Límite permitido COVENIN (1431-82)	Coliformes totales y fecales UFC/100mL	Frecuencia	Porcentaje (%)
1		$\leq 1 \times 10$	1	25
2	<100	$\leq 1 \times 10$	1	25
3	UFC/100mL	$\leq 1 \times 10$	1	25
4		$\leq 1 \times 10$	1	25
Total		-	-	100

Fuente: Vargas y García (2017).

De manera similar, las Normas Oficiales para la Calidad del Agua Argentina establecen para bacterias coliformes investigadas en 100 mL de muestra que su valor sea igual o menor de 3 UFC/100mL, mientras que la propuesta de Norma de Argentina NSO 67.18.02:10 Bebida a Base de Agua

Saborizada, establece como límite máximo de coliformes fecales que el recuento sea $<0\text{UFC}/100\text{mL}$. En otras palabras, las muestras de agua saborizada estudiadas resultan aceptables desde el punto de vista microbiológico en cuanto al cumplimiento de a este parámetro según lo establecido en normativas internacionales.

Por otra parte, Dugarte y Rojas (2012), realizaron una investigación denominada Microbiota bacteriana heterótrofa de aguas minerales envasadas de consumo en los municipios Libertador y Campo Elías del estado Mérida, en la que a diferencia de los trabajos de investigación anteriores, obtuvieron como resultado presencia de Coliformes totales y fecales en un 72,72% de las aguas minerales que estudiaron. Los investigadores afirmaron que la presencia de Coliformes fecales en las muestras de agua mineral eran indicativos de una contaminación microbiológica de origen fecal, mientras que la presencia de Coliformes totales, solo indicaba la existencia de contaminación microbiana, sin informar sobre su origen. En este sentido, cabe destacar el hecho de que a pesar de tratarse de muestras de agua mineral envasada, no se encuentran exentas de presentar crecimiento microbiano y su consumo podría resultar riesgoso para la salud.

En un estudio realizado por Zavalaga (2013), sobre la calidad microbiológica y fisicoquímica del agua embotellada comercializada en la ciudad de Tacna, en Perú, se estudiaron muestras de agua mineral de diferentes marcas, adquiridas en diferentes distritos de la ciudad. Al realizar el análisis el autor observó que en seis de las once marcas analizadas hubo presencia de Coliformes totales quedando en evidencia que las mismas no cumplieron con la norma que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano (NTS N° 071 – MINSA/DIGESA-V.01), la cual indica ausencia de coliformes totales/100 mL en aguas envasadas no carbonatadas.

En el trabajo de investigación anterior resalta una vez más el hecho de que a través del consumo de aguas envasadas se puede lesionar la salud de los consumidores. La evidencia de Coliformes Totales y Fecales en las muestras analizadas en dicho estudio pudo haber llevado a las personas que consumieron estas aguas a patologías gastrointestinales propias de estas bacterias, situación que muchas veces no se relaciona con el agua envasada por cuanto los consumidores suelen tomar el agua embotellada con confianza, convencidos de su calidad (Carrillo y col., 2008).

En una investigación similar, Benitez y col. (2013), encontraron coliformes totales y fecales, en diferentes marcas de aguas envasadas obtenidas de diversos expendios de la ciudad de Maracaibo. Los resultados mostraron, que de las diez marcas comerciales de agua envasada estudiadas, la mayor parte de ellas, evidenciaron crecimiento microbiano de coliformes totales superior a los valores permitidos por la norma COVENIN 1431-82, que como se mencionó anteriormente, establece para estos microorganismos un límite permisible de 0 hasta 10 NMP/100mL en el agua potable envasada.

Según los nombrados investigadores, la presencia de coliformes en las muestras de agua que estudiaron probablemente fue debido a que las fuentes de agua mineral se encontraban contaminadas por agua superficial o agua que drenaba de superficies contaminadas; revelando por tanto, un deficiente control del medio ambiente que rodea el lugar donde se obtiene y envasa el agua, e indicando ineficiencia durante el tratamiento de las mismas, así como falta de higiene durante el proceso de envasado, almacenamiento, distribución y filtración (Torner y col., 2009).

En relación a la determinación de *Pseudomonas aeruginosa* en las aguas saborizadas de la presente investigación, tal como se muestra en la tabla 9, en ninguna de las cuatro muestras analizadas hubo presencia de este microorganismo. Al confrontar este resultado con la Norma COVENIN

para agua potable envasada (1431-82) se evidencia que las muestras cumplen con los lineamientos exigidos ya que el límite permitido es de 0UFC/100mL. De igual forma, las Normas Oficiales para la Calidad del Agua Argentina establecen para *Pseudomonas aeruginosa* ausencia en 100 mL de muestra, en tal sentido los resultados obtenidos en cuanto a este indicador de calidad sanitaria para las aguas saborizadas analizadas se encuentran conformes inclusive frente a la normativa argentina.

Tabla 9. Cuantificación de *Pseudomonas aeruginosa* en las muestras de agua mineral y aguas minerales saborizadas analizadas

Muestra	Límite permitido COVENIN (1431-82)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UFC/100mL	Frecuencia	Porcentaje (%)
1	0UFC/100mL	$\leq 1 \times 10$	1	25
2		$\leq 1 \times 10$	1	25
3		$\leq 1 \times 10$	1	25
4		$\leq 1 \times 10$	1	25
Total		-	-	100

Fuente: Vargas y García (2017).

Estos resultados son similares a los reseñados por Bonilla y Henríquez (2014), en su análisis microbiológico de aguas saborizadas comercializadas en supermercados de San Salvador. Estos investigadores obtuvieron resultados negativos para las treinta muestras recolectadas en los supermercados, es decir no hubo presencia de *Pseudomonas aeruginosa* cumpliendo así con las especificaciones de la Norma Salvadoreña Obligatoria NSO 13.07.02:08 Agua: Agua envasada. De este modo se podría sugerir que las aguas saborizadas constituyen un producto que goza de una calidad microbiológica adecuada, pudiendo inclusive resultar más seguro su consumo en comparación con otra clase de bebidas, sin embargo se requieren estudios adicionales para sustentar esta propuesta.

Debido a que la mayoría de normas sanitarias referente a la calidad microbiológica de las aguas minerales embotelladas, elaboradas por los distintos países, establecen la ausencia total de *Pseudomonas aeruginosa*, pocos autores reportan una cuantificación de esta bacteria (Hunter, 1993). No obstante, algunos autores señalan que ciertas especies de *Pseudomonas* se han aislado en el agua del enjuague final de máquinas lavadoras de botellas, lo que advierte el riesgo de contaminación antes del proceso de llenado y comercialización, pues su posterior multiplicación durante el almacenamiento, representa un peligro para los consumidores. Es necesario destacar que estas bacterias son capaces de colonizar ambientes húmedos ocasionando infecciones en el tracto pulmonar, tejidos y heridas (Payares y col., 2013).

En este sentido, Vidal y col. (2009), en un estudio de aguas minerales envasadas en bolsas de polietileno, con destino al consumo humano, concluyeron que de un total de trece marcas estudiadas, una de ellas presentó *Pseudomonas aeruginosa*. Según los investigadores, la presencia de este patógeno es posiblemente debido a la acumulación de biopelículas en los equipos de procesamiento, donde estas bacterias pueden permanecer por un largo periodo en razón a su alta resistencia, y en caso de existir condiciones favorables, dicho microorganismo es capaz de multiplicarse en las redes y conexiones del sistema de aguas en el proceso de envasado, lo que resulta preocupante debido a que es un germen oportunista del sistema respiratorio y tejidos blandos.

Por otra parte, en relación a la determinación de mohos y levaduras en las muestras de agua saborizada, en la tabla 10 se puede apreciar que luego de la incubación se observó crecimiento de mohos en dos de las muestras, específicamente en el agua saborizada de mandarina y agua mineral natural.

Tabla 10. Determinación de mohos y levaduras en las muestras de agua mineral y aguas minerales saborizadas analizadas

Muestra	Límite permitido COVENIN 2182-95	Mohos y Levaduras UFC/100mL	Frecuencia	Porcentaje (%)
1		1 x 10	1	25
2	10 a 100	$\leq 1 \times 10$	1	25
3	UFC/100mL	1 x 10	1	25
4		$\leq 1 \times 10$	1	25
Total		-	-	100

Fuente: Vargas y García (2017).

A pesar de que en Venezuela no existe una normativa específica para aguas saborizadas y en la norma COVENIN 1431-82 para agua potable no se especifica la determinación de mohos y levaduras, se sugiere su comparación lo establecido en la norma COVENIN 2182-95 para bebidas gaseosas, dada la similitud de algunos de los ingredientes utilizados en la elaboración de aguas saborizadas.

Esta normativa COVENIN para bebidas gaseosas establece como límite máximo para el recuento de mohos entre 10 a 100 UFC/100mL y levaduras de 1 a 10 UFC/100mL, es decir, que las muestras de agua saborizada de mandarina (1 UFC/mL) y agua mineral natural (1 UFC/mL) cumplen con lo establecido por los estándares nacionales en cuanto a este indicador de calidad sanitario.

Por otra parte, al comparar los resultados de mohos y levaduras obtenidos en este estudio, con la Norma Salvadoreña para Bebidas a Base de Agua Saborizada (NSO 67.18.02:10) que establece como límite permisible de 10 hasta 100UFC/mL, puede afirmarse que las muestras de agua saborizadas expendidas en un Automercado del municipio Libertador

del estado Mérida, se encuentran dentro de este rango y su calidad sanitaria es aceptable.

En general, el bajo recuento de microorganismos resultante del análisis de las muestras de agua saborizadas en la presente investigación, probablemente se deben a que para otorgarles sabor y color a las aguas minerales saborizadas, se le agregan sustancias naturales y/o artificiales que las acidifican, lo que podría inhibir el crecimiento y desarrollo de ciertos microorganismos en el producto.

En el Gráfico 1 presentado a continuación, se resume el crecimiento microbiano resultante tras el análisis microbiológico de las diferentes muestras de agua saborizada mediante el método de filtración en membrana.

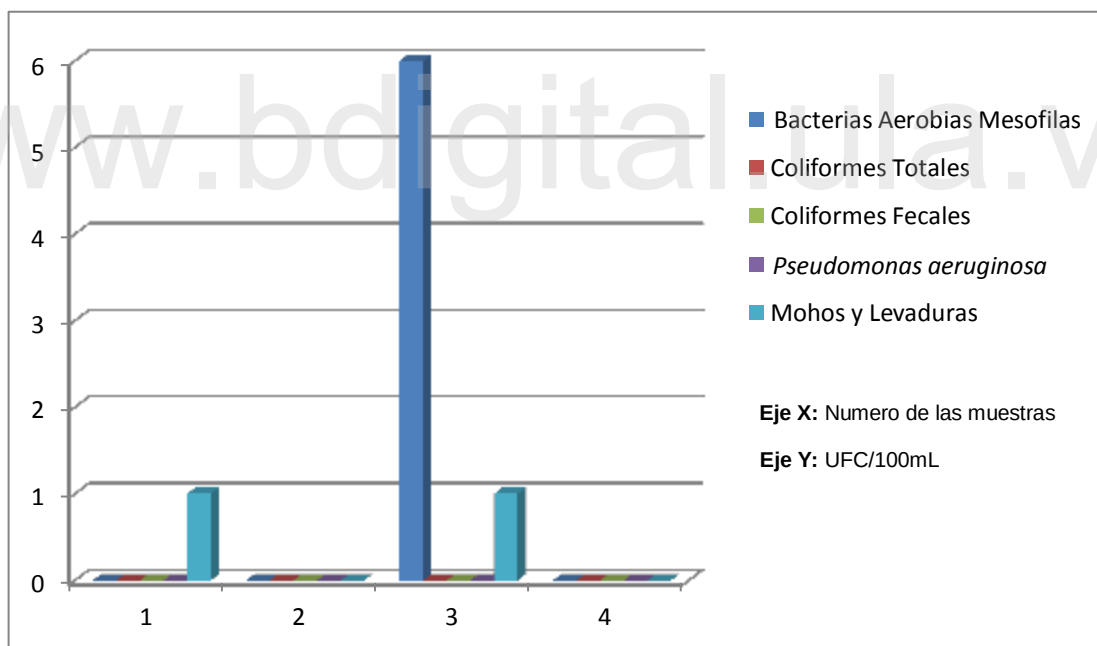


Grafico 1. Distribución de crecimiento bacteriano en las muestras de agua mineral y aguas minerales saborizadas analizadas

Fuente: Vargas y García (2017).

Como se puede observar en el gráfico anterior, la muestra número 3 (agua mineral envasada saborizada sabor a mandarina) fue la que presentó mayor crecimiento de microorganismos, específicamente Bacterias Aerobias Mesófilas y Mohos. Seguidamente la muestra número 1 (agua mineral envasada natural) sólo presentó crecimiento de Mohos, mientras que las muestras número 2 y número 4 (agua mineral envasada saborizada sabor a toronja y sabor a Jamaica respectivamente) no demostraron crecimiento microbiano alguno al momento del estudio. Por tal razón se podría decir que las aguas minerales saborizadas poseen una calidad microbiológica aceptable para su consumo.

Es necesario destacar que las aguas saborizadas por ser un producto innovador en el mercado de las bebidas, han contado con gran aceptación por los consumidores gracias a sus atributos, combinando así el agua, la fruta y otros ingredientes que probablemente contribuyen a mejorar su calidad microbiológica, tal es el caso de los agentes conservadores o conservantes que suelen añadirse a los jugos, refrescos y bebidas artificiales.

Por otra parte, los parámetros fisicoquímicos de esta clase de productos también ejercen una influencia en el desarrollo de microorganismos. La acidez es el factor más importante en la preservación de refrescos. El pH bajo aumenta en gran medida los efectos del tratamiento térmico y actúa como una barrera para el crecimiento de microorganismos.

A continuación se resumen en la tabla 11, los resultados de las determinaciones de pH y temperatura de las muestras de agua mineral estudiadas:

Tabla 11. Determinación de pH y Temperatura en las muestras de agua mineral y aguas minerales saborizadas analizadas

Muestra	pH	Temperatura (°C)
1	5,0	4
2	3,0	4
3	4,0	4
4	3,0	4

Fuente: Vargas y García (2017).

Como puede observarse en la tabla anterior, los valores de pH de todas las muestras de agua mineral se encuentran en el rango de pH ácido. La muestra 1 (agua mineral natral) tiene un pH de 5,0. La muestra 3 (agua mineral saborizada de mandarina) su pH es 4,0. Para las muestras 2 y 4 (agua mineral saborizada de toronja y Jamaica) el pH es más ácido con un valor de 3,0. Según Stratford y col. (2003), el valor de pH de la mayoría de los refrescos está por debajo de 4.0 y la gran mayoría de las bacterias heterotróficas no pueden crecer a un pH tan bajo, mientras que el crecimiento de hongos es posible a bajos niveles de pH. Dichas afirmaciones coinciden con lo encontrado en esta investigación, en la que sólo se obtuvieron recuentos de Bacterias Aerobias Mesófilas en una de las muestras y crecimiento de mohos en dos de ellas, evidenciando su mayor capacidad de supervivencia frente a pH ácido.

Por otra parte, la temperatura también influye en el crecimiento de microorganismos, el almacenamiento refrigerado se usa a menudo para extender la vida útil después de abierto el envase en bebidas artificiales o pasteurizadas, tales como las bebidas a base de zumos de fruta. Por esta

razón, al momento de la recolección se comprobó que las muestras se encontraban almacenadas en una nevera a una temperatura de 4°C y se mantuvieron refrigeradas hasta su análisis. Posiblemente esta práctica adecuada de almacenamiento refrigerado de las aguas saborizadas, contribuyó a que los recuentos microbianos obtenidos fueran poco abundantes y se encontraran dentro de los límites establecidos por las normas venezolanas.

www.bdigital.ula.ve

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

- Se observó crecimiento de bacterias aerobias mesófilas (BAM), en la muestra de agua mineral saborizada de mandarina con un recuento de 6 UFC/100mL. Igual se mantiene dentro del rango de aceptación de la Norma Nacional e Internacional.
- En ninguna de las muestras se evidencio crecimiento de coliformes totales y coliformes fecales.
- Todas las aguas minerales envasadas saborizadas están libres de *Pseudomonas aeruginosa*.
- Las muestras 1 y 3 (agua mineral natural y agua saborizada de mandarina) presentaron crecimiento de mohos igual a 1 UFC/100mL.
- Las cuatro muestras de agua mineral envasada analizadas resultaron conformes a los parámetros de las Normas venezolanas COVENIN 1431-82 para agua potable envasada y COVENIN 2182-95 para bebidas gaseosas, considerándose seguras para consumo humano.
- Se confirma la hipótesis propuesta en la que se afirma que las aguas minerales envasadas saborizadas que se expenden en un automercado del municipio Libertador cumplen con los requisitos establecidos para las normas venezolanas COVENIN y es apta para el consumo humano.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda a la Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN), diseñar normas que establezcan parámetros de análisis fisicoquímicos y microbiológicos, específicos para aguas saborizadas, que permitan contar con una referencia oficial al momento de realizar el control de calidad de estos productos.
- Ampliar el muestreo de aguas minerales envasadas saborizadas, de diferentes marcas con la finalidad de obtener resultados más representativos de la calidad microbiológica de los productos.
- Realizar estudios donde se utilicen medios de cultivos enriquecidos ya que los microorganismos que pueden existir en las aguas saborizadas posiblemente necesiten más nutrientes para su crecimiento y desarrollo en condiciones experimentales.
- Complementar el estudio utilizando galerías api o herramientas de biología molecular para identificar los microorganismos aislados en aguas saborizadas.

BIBLIOHEMEROGRAFIA

Ahmad, M. y Bajahlan, A. (2007). Lixiviación de estireno y Otros compuestos aromáticos en el agua potable de las botellas PS. *Revista de Ciencias Ambientales*. 19 (4), 421-426.

Alonso, P. (2016). Análisis tecnológicos y prospectivos sectoriales. Complejo productivo de aguas saborizadas. Argentina.

American Public Health Association (APHA). (2001). Drinking water quality and public health. *Journal. of public health*. 91. 499-500.

American Public Health Association (APHA). 1981. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 15th ed., *American Public Health Association*, Washington D.C. USA. pp 1134.

American Publica Meath Asociación (APHA) USA, AWAA (American wáter Works Asociación) USA, Wáter Polución Control Federación, USA (WPCF). 1992. Métodos Normalizados para el análisis de aguas potables y residuales. Madrid: 17a Edición, Es. Ediciones Díaz de Santos S.A.

Andueza, F. (2009). El agua mineral envasada puede ser peligrosa. *Revista Investigación*. 19. 20-23.

Apella, M., & Araujo, P. (2005). Microbiología del agua. Conceptos Básicos. *Tecnologías Solares para la Desinfección y Descontaminación del Agua*. 33-50.

Apella, M., Araujo, P. (2012). *Microbiología del agua. Conceptos Básicos.*
Disponible: [www. Psa. es/ es/ projects/ solar safe wanter / documents/ libro/ 02_capitulo_02. Pdf](http://www.Psa.es/es/projects/solar-safe-wanter/documents/libro/02_capitulo_02.Pdf). Consultado 22 de agosto de 2017.

Araque, J. (2012). *Estudio Microbiológico de las aguas minerales envasadas.* Tesis de maestría. Universidad de Los Andes. Mérida. Venezuela.

Armijo, M. (2001). Sanitary characteristics of bottled drinking water. *An. R. Acad. Nac. Med.* (Madr). 118: 459-474.

Armijo, M.; San Martin, J. (1994). *Curas balnearias y climáticas.* Madrid. España: Editorial Complutense.

Ashurst. P. and Hargitt. R. (2009). *Soft Drink and Fruit Juice Problems Solved*, CRC Press, Wood head Publishing, Oxford, UK.

Aurazo, M. (2009). *Aspectos biológicos de la calidad del agua.* Disponible en: <http://cdam.minam.gob.pe:8080/bitstream/123456789/109/3/CDAM0000012-3.pdf>. Recuperado el 20 de Noviembre 2012

Baggini, S. (2014). *Seguridad alimentaria, bromatología y microbiología de los alimentos.* Disponible en: https://bagginis.blogspot.com/2014/07/guia-practica-del-laboratorio_8.html. Recuperado el 29 septiembre 2017.

Ballester, L. (2002). *Evaluación del contenido de bacterias aerobias mesófilas y coliformes en crema de leche expendida en Mérida.* Trabajo de acenso. Facultad de Farmacia. Universidad de los Andes.

Battey, A., Duffy, S. and Schaffner, D. (2002). —Modeling yeast spoilage in cold-filled ready-to-drink beverages with *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii*, and *Candida lipolytica*. *Applied and Environmental Microbiology*. 68. (4), 1901–1906.

Benítez, B., Ferrer, K., Rangel, L., Ávila, A., y Levy, A. (2013). *Calidad microbiológica del agua potable envasada en bolsas y botellas que se venden en la ciudad de Maracaibo, estado Zulia-Venezuela.* Universidad del Zulia. Maracaibo.

Bischofberger, T., Cha, S., Schmitt, B., König y Schmidt, L. (1990). —The bacterial flora of non-carbonated, natural mineral water from springs to reservoir and glass and plastic bottles. *International Journal of Food Microbiology*. 11. 51-72.

Bonilla, J. y Henríquez, K. (2014). *Análisis Microbiológico y Fisicoquímico de aguas saborizadas embotelladas comercializadas en los supermercados de Metrocentro y Metrosur, San Salvador.* Tesis de grado. Universidad de El Salvador. San Salvador, El Salvador.

Cabo De La Puente, C. (1972). *Bacteriología y potabilidad del agua,* España: Editorial Blume. Ampliar

Calderón, G. (2009). *Estudio de caso—Enfermedades transmitidas por alimentos en El Salvador.* Consultor FAO. [En línea] Disponible en: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/011/i0480s/i0480s03>. Consulta 15 de febrero de 2014.

Camel, E. (2007). Pepsi le puso sabor a Minalba para despertar el mercado. Caracas 27 de abril del 2000. El Universal. www.eluniversal.com/2007/04/27/eco_art_pepsi_le_puso_sabor_266311. Recuperado: 05 de enero de 2016

Canadean Beverage Categories Definitions. (2008). Disponible en: <http://www.liquidforecasts.com/CanadeanDefinitions.pdf>.

Cantizzano, I. (2006). Agua Alpina duplicará su producción. El Diario de Hoy, El Salvador [On line]. Disponible en: <http://www.elsalvador.com/noticias/2006/05/22/negocios/neg11.asp>

Carrero, A. y Morales, S. (2010). *Microbiota de las aguas minerales envasadas que se expenden en la zona fronteriza Colombia- Venezuela (Cúcuta-San Cristóbal)*. Trabajo de grado. Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.

Carrillo, E., Lozano, A. (2008). *Validación del Método de detección de Coliformes Totales y Fecales en agua potable utilizando agar Chromocult*. Tesis de Post-Grado. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá-Colombia.

Castillo, A., Osorio, Y. y Vence, L. (2009). *Evaluación de la calidad microbiológica y fisicoquímica de aguas subterráneas ubicadas en los municipios de la Paz y San Diego- Cesar*. Tesis para optar el grado de Microbióloga. Universidad popular del cesar. Facultad de Ciencias de la Salud. Colombia.

Chaidez, C. (1999). —Risk Assessment of selected opportunistic pathogens in drinking water. Ph.D. Dissertation, University of Arizona, Tucson, Arizona, EE.UU.

Chaidez, C. (2002). Agua Embotellada y su Calidad Bacteriológica. *Agua Latinoamérica*. 38-39.

Chapelle, F. (2005). *Wellspring: A Natural History of Bottled Spring Water*. Piscataway: Rutgers University Press. USA.

Chaudhari, N. and Roper, S. (2010). —The cell biology of taste. *Journal of Cell Biology*. 190. (3), 285–296.

Chiappe, G. (2017). *Las botellas de agua recicladas deben lavarse a diario.*

Disponible en: http://www.eluniversal.com/noticias/estilo-vida/las-botellas-agua-recicladas-deben-lavarse-diario_18962. Recuperado el 09 de Octubre de 2017.

Collins, C. Lyne, P. (1989). *Métodos microbiológicos.* Zaragoza – España: Editorial Acribia, S.A.

Comité Venezolano de Normas Industriales (COVENIN). (1982). Agua potable envasada. Norma COVENIN No. 1431-82. Comité Venezolano de Normas Industriales (COVENIN). Caracas. Venezuela.

Cruz,A. (2015). Diseño de una bebida nutricional saborizada a base de aguamiel (Chaguarmishqui) de penco (*Agave americana* L) enriquecida con amaranto (*Amaranthus caudatus* L). Tesis. Universidad central de Ecuador. Ecuador.

Da Silva M, Santana R, Guilhermetti M, Filho I, Endo EH, Nakamura T y col. (2008). Comparison of the bacteriological quality of tap water and bottled mineral water. Int J Hyg Environ Health, in press.

Davenport, D. (2005). Microbiology of soft drinks, in Chemistry and Technology of Soft Drinks and Fruit Juices, P. Ashurst, Ed. Academic Press, CRC, Sheffield,UK. pp. 197–216

Delgado, S. y Morales, F. (2015). *Detección de Pseudomonas aeruginosa y bacterias heterótrofas de aguas envasadas en botellas y bolsas destinadas al consumo humano, comercializadas en la ciudad de Managua.* Trabajo de grado. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua. Managua.

Di Nucci, J. (2011). Circuito superior de bebidas gaseosas y aguas saborizadas en Buenos Aires-Argentina: Organización y capital. *Revista Geográfica Venezolana.* 52 (2), 61-80.

Díaz, C. (2000). *Microbiología de la leche y de los productos lácteos*. Mérida: Editorial Venezolana.

Díaz, J., Caraballo, H., Villareal, M., Lobo, H. (2007). ¿El Agua Embotellada es adecuada para nuestro consumo? 6 (11), 2-12.

Downes Fp, Ito K. (2001). Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Washington: 4º Ed, APHA. p 53, 569 y 573.

Dugarte, F. y Rojas, M. (2012). *Microbiota bacteriana heterótrofa de aguas minerales envasadas de consumo en los municipios Libertador y Campo Elías del estado Mérida. Venezuela*. Trabajo de grado. Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.

EFSA, “Scientific opinion on the re-evaluation of Ponceau 4R (E 124) as a food additive,” (2009). *The EFSA Journal*. 7 (11), 1328.

FAO, (1997). Small-scale food processing. A guide for appropriate equipment. Disponible en <http://www.fao.org/WAIRdocs/x5434e/x5434e00.htm#Contents>. Consultado 25 de septiembre de 2002.

Fidias, Arias. (2004). *El Proyecto de Investigación Introducción a la metodología científica*. Caracas-Venezuela: 4ª edición. Editorial Episteme. Pp 24-61; ISBN: 980-07-8529-9.

Filtborg, O., Frisvad, J. and Samson, R. (2004). —Specific association of fungi to foods and influence of physical environmental factors, in Introduction to Food-and Airborne Fungi, R. A. Samson, E. H. Hoekstra, and J. C. Frisvad, Eds., Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands. pp. 306–320

Fitch, C. and Keim, K. (2012). —Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: use of nutritive and nonnutritive sweetenersll. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*. 112 (5), 739–758.

Fortunecity. (2000). Disponible en <http://www.fortunecity.es/expertos/profesor/171/agua.html>

Fuentes, A., Campas, O., Aguilar, M., Meza, M. (2005). Calidad microbiológica del agua de consumo humano de tres comunidades rurales del Sur de Sonora (México). *Revista Salud Pública y Nutrición*. 8 (3), 7.

Gaceta Oficial De La República Bolivariana De Venezuela. (1998). Ministerio de Sanidad y asistencia social. N° 36.395. Caracas. Venezuela.

Glevitzky, M., Dumitrel, G., and Popa, M. (2009). —Studies regarding non-enzymatic browning of orange and apple juices during storagell. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*. 4. 511–514.

Gomes, L., López, R., Peterson, F., Maza, M. (2001). *Evaluación de la calidad bacteriológica del agua envasada comercializada en la zona céntrica de Cartagena-Colombia*. Tesis de grado. Universidad de Cartagena. Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Cartagena-Colombia. .

Gómez, M., Peña, P., Vázquez, M. (1999). *Determinación y diferenciación de Escherichia coli y Coliformes Totales usando un sustrato cromógeno*. Laboratorio Central. Aquagest. Galicia, España.

González, C., Gutiérrez, C. y Grande, T. (1987). —Bacterial flora in bottled un carbonated mineral drinking waterll. *Canadian Journal of Microbiology*. 33. 1120-1125.

- Gray, N. (1996).** Calidad del agua potable, problemas y soluciones. Zaragoza. España: 1era ed. Editorial Acribia S.A. pp 388
- Grüber, R., Mata, J. (2010).** *Bacteriología del agua de consumo de los servicios sala de parto, cirugía y emergencia de adultos, hospital "Dr. Raúl Leoni". San Félix estado Bolívar.* Tesis para optar la licenciatura en Bioanálisis. Universidad De Oriente Núcleo de Bolívar. Escuela De Ciencias de La Salud. VENEZUELA.
- Gruenwald, J. (2009).** —Novel botanical ingredients for beverages. *Clinics in Dermatology*. 27 (2), 210–216.
- Gunther y López (2006).** *Antecedentes Importancia del agua.* [On line]. Disponible en: http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lic/de_a_lm/capitulo1.pdf
- Hausmann, S. (2009).** —Tooth-friendly beverages can now be manufactured thanks to the functional carbohydrate. *Wellness Foods Europe*. 11. 26–29.
- Hayes, (1993).** *Microbiología e Higiene de los Alimentos.* Zaragoza España: ACRIBIA.
- Horsakov 'a, I., Vold, M., Ce rovsky, P., Sedl, P., Sicnerov, P., y Ulbrich, P. (2009).** —Como una bacteria que decae la Empaquetado aún las bebidas de fruta ", *Revista Checa de Ciencias de la Alimentación*. 27. 362-365.
- Hunter, P. (1993).** The microbiology of bottled natural mineral waters. *Journal of apllied Bacteriology*. 74. 345-352.
- Hunter, P., Burger, H., Hornby, H. (1990).** A assessment of the microbiological safety of bottled mineral waters. *Revista Italiana d' Igiene*. 50. 394-400.

Hurtado, J. (2010). El proyecto de investigación: metodología de la investigación holística. 4a. ed. Caracas, Venezuela.

Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación, ICONTEC. (2012). Norma Técnica Colombiana NTC 5514. El Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación, ICONTEC. Colombia. [On line]. Disponible en: <http://tienda.icontec.org/brief/NTC5514.pdf>

Instituto de Investigación Agua y Salud. (2008). Disponible en: <http://institutoaguaysalud.es/agua-mineral-natural/> Consultado 07 septiembre de 2017.

Instituto Nacional de Estadística. (2015). Proyecciones de población. Mérida

Iriarte, M. (2009). Calidad bacteriológica de las aguas embotelladas comercializadas en la isla de Margarita (Venezuela) durante 2002-2008. *Scielo. Ciencia*. 17 (3).

Jackson, R. (1990). Waters and spas in the classical world. *Med. Hist.* 10. 1-13

Jácome, A., González, G., Saltos, N. (2010). *Comercialización y distribución del agua de Jamaica con sabor a limón en la ciudad de Guayaquil*. Tesis de Grado. Escuela superior politécnica del litoral. Guayaquil. Ecuador.

Jay, M. (2000). *Modern Food Microbiology*, Aspen Publishers, Aspen, Colo. USA.

Jeena, M., Deepa, P., MujeebRahiman, K., Shanthi, T., Hatha, A. (2006). Risk assessment of heterotrophic bacteria from bottled drinking water sold in Indian markets. *Int J Hyg Environ Health*. 209.191-196.

- Ju, P. y Jinru, C. (2009).** "Calidad microbiana de refrescos servidos por las máquinas expendedoras en restaurantes de comida rápida y conveniencia tiendas en Griffin, Georgia, y sus alrededores". *Journal of Food Protection*. 12. 2448 – 2681.
- Kasenga, G. (2007).** The health-related microbiological quality of bottled drinking water sold in Dar es Salaam, Tanzania. *Journal Water Health*. 5. 179-185.
- Kokare, C., Chakraborty, A., Khopade, N., y Mahadik, K. (2009).** "Biofilm: importancia y aplicaciones". *Indian Journal De Biotechnology*. 8 (2), 159 – 168.
- Korzeniewska. E., Filipkowska. Z., Domeradzka. S. and Włodkowski. K. (2005).** —Microbiological quality of carbonated and noncarbonated mineral water stored at different temperatures. *Polish Journal of Microbiology*. 54. 27–33.
- Kregiel, D., Rygala, A., Libudzisz, Z., Walczak, P., and Oltuszk-Walczak, E. (2012)** —*Asaia lannensis*-the spoilage acetic acid bacteria isolated from strawberry-flavored bottled water in Poland. *Food Control*. 26 (1), 147–150.
- Kuhn I y col. (1997).** *Appl Environ Microbiol* 63: 2708.
- Lafuente, E., Catalan, E., Pacheco, N., Catalan, J. (2000).** *Tratado del agua: Control de la contaminación y depuración*. Mérida. Venezuela: Edición Santa María.
- Lamoreaux, P., Tanner, J. (2001).** Spring and bottled waters of the world: Ancient history, source, occurrence, quality and use. USA: Edit. Springer Verlag.

Larrañaga, I., Carballo, J., Rodriguez, M., Fernandez, J. (1999). *Control e higiene de los alimentos*. España: Editorial Mc Graw Hill.

Lawlor. K., Schuman. J., Simpson. P., and Taormina. J. (2009). —Microbiological spoilage of beverages,II in Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages, W. H. Sperber and M. P. Doyle, Eds., Food Microbiology and Food Safety, Springer. New York, USA. pp. 245–283.

Leclerc, H., Da Costa, M. (2004). *Microbiology of natural mineral waters*. In: *Technology of Bottled water*. Second Edition. Edited by Dorothy Senior and Nicholas Dege. Blacwell. Publishing.

Macías, I., Orellana, E., y Reyes, W. (2010). Proyecto para la introducción y comercialización de la bebida vital water en el mercado de la ciudad de Guayaquil. Escuela Politécnica del Litoral. Guayaquil.

Macías, J. (2015). *Evaluación de la calidad físico química y microbiológica de las aguas embotelladas, comercializadas en la ciudad de Babahoyo*. Tesis presentada como requisito para optar por el grado de magíster en salud pública. Guayaquil, Ecuador.

Madigan, M., Martinko, J., Dunlap, P., Clark, D. (2009). *Biología de los microorganismos*. Duodécima edición. Pearson Educación.

Mañas, R. (2009). *El agua es vital para combatir el envejecimiento y el sobrepeso*. Diario femenino [On line]. Disponible en: <http://www.diariofemenino.com/dieta/dieta-sana/articulos/el-agua-es-vital-para-combatir-el-envejecimiento-y-el-sobrepeso/>

Martínez, T., Pérez, L. (2010). *Calidad bacteriológica de agua potable envasada comercialmente*. Tesis de Pregrado, Universidad de Oriente. Ciudad Bolívar.

Mims, J., Playfair, I., Roitt, D., Wakelin, W. (1999). *Microbiología Moderna.*

Madrid, España: 2ª ed .Harcourt Brace. Pp 314.

Moore J y col. (2002). *Appl Environ Microbiol* 68: 4130.

Moreno, E., (2013). *Metodología de la investigación pautas para hacer tesis.*

Disponible en: <http://tesis-investigacion-cientifica.blogspot.com/2013/08/que-es-operacionalizacion-variables.html>.

Mortensen, A. (2006). —Sweeteners permitted in the European Union: safety aspects, *Scandinavian Journal of Food and Nutrition*. 50 (3), 104–116.

Mossel, D. (1976). Various taxo – and ecogroups of bacteria as index organisms for the enteric contamination of bottled waters. *Annali dell' Instituto Superiore di Sanita*. 12. 177-190.

Naddeo, V., Zarra, T., Belgiorno, V. (2007). A comparative approach to the variation of natural elements in Italian bottled waters according to the national and international standard limits. *J Food Comp Anal*. 10. 68-69.

Norma Técnica Colombiana (NTC 5514). (2012). Bebidas no alcohólicas.

Agua saborizada y refrescos de agua saborizada. Icontec internacional. Primera actualización editada.

Norma Técnica Colombiana (NTC) 4772 (2008). Calidad del agua

detección y recuento de *Escherichia coli* y de bacterias coliformes. PARTE 1: Método de filtración por membrana. ICONTEC.

Norma Venezolana COVENIN 1431-82. (1982). Agua Potable Envasada

Requisitos. Fondonorma. Caracas. Venezuela.

Norma Venezolana COVENIN. (1986). Agua. Método de la membrana

filtrante para análisis microbiológico. 1ra revisión. Fondo norma. Caracas. Venezuela.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). (2006). Guías para la calidad del agua potable. Primer apéndice a la tercera edición, volumen 1. Ediciones de la OMS. Ginebra - Suiza.

Organización Panamericana De La Salud. (1987). Guías para la calidad del agua potable. Pub. Cient. Vol 12.

Organización Panamericana de la Salud-Organización Mundial de la Salud (1998). Análisis del sector de agua potable y saneamiento en Venezuela. Plan regional de inversiones en ambiente y salud. Organización Panamericana de Salud (OPS). Organización Mundial de Salud, OMS. Ginebra. Suiza.

Park, Y. and Chen, J. (2009). —Microbial quality of soft drinks served by the dispensing machines in fast food restaurants and convenience stores in Griffin, Georgia, and surrounding areas, *Journal of Food Protection*. 72 (12), 2607–2610.

Payares, B., Villasmil, K., Matos, L., Larreal, A., Barboza, Y. & Levy, A. (2013). *Calidad microbiológica del agua potable envasada en bolsas y botellas que se venden en la ciudad de Maracaibo, estado Zulia-Venezuela.* Venezuela.

Payment, P. (1994). Fate of human enteric viruses, *Coliphages* and *Clostridium perfringens* during drinking-Water Treatment. *Canadean. Journal. Microbiol.* 37. 154-157.

Payment, P., Franco, E., Richardson, L., Siemiatycki, J. (1991). Gastrointestinal Health effects associated with the Consumption of Drinking Water Produced by Point – of –Use Domestic Reverse – Osmosis Filtration Units. *Applied and Environmental Microbiology*. 57 (4), 945-948.

Pérez, J., (2011). *Aspectos socio-económicos del sector de aguas envasadas, y su evolución.* Panorama actual de las aguas minerales y minero-medicinales en España. 6-10.

Ramírez, J., Ulloas, P., (2011). *Bacterias lácticas: importancia en alimentos y sus efectos en la salud.* Disponible en: <http://fuente.uan.edu.mx/publicaciones/03-07/1.pdf>.

Ramos, A. (2009). El control oficial de alimentos: una herramienta básica para la Seguridad Alimentaria. Universidad de Lleida. Malabo.

Reyes, M., Pérez, C., Negrón, E. (2008). Microbiological assessment of house and imported bottled water by comparison of bacterial endotoxin concentration, heterotrophic plate count, and fecal coliform count. *PR Health Sci J.* 27 (1), 21-26.

Rheinheimer, G. (1987). *Microbiología de las aguas.* Zaragoza-España: Primera edición. Editorial. Acribia.

Richards, J., Stokely, D. and Hipgrave, P. (1992). Quality of drinking water. *British Medical Journal.* 304-371.

Rivera, I. (2009). *Las mejores y las peores aguas saborizadas.* Disponible en: https://www.planetajoy.com/?Las_mejores_y_las_peores_aguas_saborizadas&page=ampliada&id=387 Recuperado el 09 de octubre de 2017.

Rodier, J., Geofray, CH., Kovacsik, G., Laponte, J., Plissier, M., Scheidhauer, J., Verneaux, J. y Vial, J. (1990). Análisis de las aguas. Barcelona- España: Ediciones OMEGA.

Rusin, P., Rose, J., Haas, C. y Gerba, C. (1997). Risk assessment of opportunistic bacterial pathogens in drinking water. *Review of Environmental Contamination and Toxicology.* 152. 57-83.

Sánchez, H., Vargas, M., Méndez, J. (2000). Calidad bacteriológica del agua para consumo humano en zonas de alta marginación de Chiapas. Salud Pública Mex.

Sedla'ckov, P., Rovsky, Ce., Hors, A., y Vold M. (2011). "Superficie celular característica del microorganismo de deterioro de Asaia bogorensis De agua embotellada". *Revista Checa de Ciencias de la Alimentación*. 29. (4), 457-461.

Senior, D. and Dege, N. (2005). Technology of bottled water. Blackwell publishing. Oxford. Uk.

Senior, D. y Ashurst, P. (2001). Tecnología del Agua Embotellada. De la edición en lengua española. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza-España.

Shen Zhen J&D Machinery Co., Ltd. (2006). *Línea de Llenado de Agua Embotellada (Equipo de Embotellamiento de Agua)*. Disponible en: <http://www.toplingfiller.com.es/bottled-water-filling-line.html>. Recuperado el 09 de Octubre de 2017.

Silva, J., Ramírez, L., Alfieri, A. (2004). Determinación de microorganismos indicadores de calidad sanitaria. Coliformes totales, coliformes fecales y aerobios mesófilos en agua potable envasada y distribuida en San Diego, estado Carabobo, Venezuela. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* 24 (1-2), 46-49.

Skoog, D. y col. (2001). *Química Analítica*. México: 7ª Ed. D.F. McGraw-Hill, p. 399, 645.

Soares, P., Silva, C. & da Cruz, O. (1996). *Pseudomonas aeruginosa* como indicador en análisis bacteriológicos de águas de abastecimento público. Associacao Brasileira de Engenharia Sanitária e ambiental. Río de Janeiro. 64p.

Sperber, W. (2009). —Introduction to the microbiological spoilage of foods and beverages, II in Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages, W. H. Sperber and M. P. Doyle, Eds., Food Microbiology and Food Safety, pp. 1–39, Springer, New York, NY, USA.

Spino, D. (1985). Characterization of Dysgonic, Heterotrophic Bacteria from Drinking Water. *Applied and Environmental Microbiology*. 50 (5), 1213-1218.

States, S. y col. (1987). Appl Environ Microbiol 53: 979.

Stratford, M. (2006). —Food and beverages spoilage yeasts, II in Yeasts in Food and Beverages, A. Querol and G. H. Fleet, Eds., pp. 335– 380, Springer, Berlin, Germany.

Stratford, M. and James, S. (2003). —Non-alcoholic beverages and yeasts, II in Yeasts in Food, T. Boekhout and V. Robert, Eds., pp. 309–345, Behr's Verlag GmbH & Co., Hamburg, Germany.

Swanson, K. (2011). —Nonalcoholic beverages, II in Microorganisms in Foods, International Commission on Microbiological Specifications for Foods, Editorial. Springer, London, UK. vol. 8, pp. 269–280.

Tampo, D. (2004). *Aguas envasadas*. México. Editorial. Limusa.

Taylor, B. (2006). —Ingredients and formulation of carbonated soft drinks, II in Carbonated Soft Drinks: Formulation and Manufacture, D. Steen and P. R. Ashurst, Eds, Blackwell Publishing, Oxford, UK. pp. 48–86

Tenge, C. and Geiger, E. (2001). —Alternative functional beverages, II

Tobin, S. (1984). Water treatment from home and cottage. *Canadian Journal. Public Health*. 75, 79-82.

- Tornero, M., Bonilla, N., Fernández, C. (2009).** *Química y Sustentabilidad Ambiental*. Publicación especial de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla. México. p. 1-16
- Tortora, G., Funke, B., Case, C. (2007)** *Introducción a la microbiología*. Buenos aires-Argentina: Novena edición, Ed. Médica Panamericana.
- Tribst, A., Sant'Ana, A. and Massaguer, P. (2009),** —Review: microbiological quality and safety of fruit juices—past, present and future perspectivesll. *Critical Reviews in Microbiology*. 35 (4), pp. 310–339.
- Vaconcelos, U., Gomes, M., y Torres, G. (2010).** *Pseudomonas aeruginosa* associated with negative interactions on coliform bacteria growth. *Canadian Journal of pure & applied Sciences*. 4. 1133-1139.
- Vidal, J., Consuegra, A., Gomes, L., Marrugo, J. (2009).** *Evaluación De La Calidad Microbiológica Del Agua Envasada En Bolsas Producida En Sincelejo – Colombia*. Colombia.
- Vilanova, S. (2004).** Evaluación de las aguas comercializadas y consumidas en la ciudad de Buenos Aires. *Revista de la Maestría en Salud Pública*. 2 (3), 1-15.
- Walker, A. (1992).** Drinking water-doubts about quality. *B.M.Journal*. 304. 175-178.
- Warburton, D., McCormick, J. y Bowen, B. (1994).** —Survival and recovery of *Aeromonashydrophila* in water: development and methodology for testing bottled water in Canada, *Canadian Journal of Microbiology*. 40. 145-148.
- Wegelin, M., Canonica, C., Alder. (2001).** "¿La luz solar cambia El material y contenido de tereftalato de polietileno (animal doméstico) Botellas?".

Journal of Water Supply: Investigación y Tecnología- AQUA. 50 (3), 125-135.

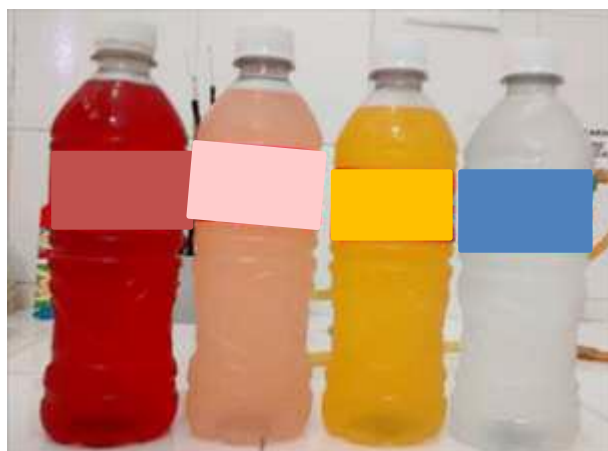
World Health Organization (WHO). (1984). International Standards for drinking water. guidelines for drinking water quality. Health criteria and other supporting information. Geneva. Vol. 2.

Zavalaga, E. (2013). *Calidad microbiológica y fisicoquímica del agua embotellada, comercializada en la ciudad de Tacna-Perú*. Tesis Doctoral. Perú.

www.bdigital.ula.ve

ANEXOS

www.bdigital.ula.ve



Anexo 1. Muestras recolectadas de aguas minerales envasadas saborizadas



Anexo 2. Equipo de filtración y bomba de vacío



Anexo 3. Preparación y envasado de los medios de cultivo utilizados en la investigación



Anexo 4. Materiales utilizados en la siembra de las muestras de agua saborizada



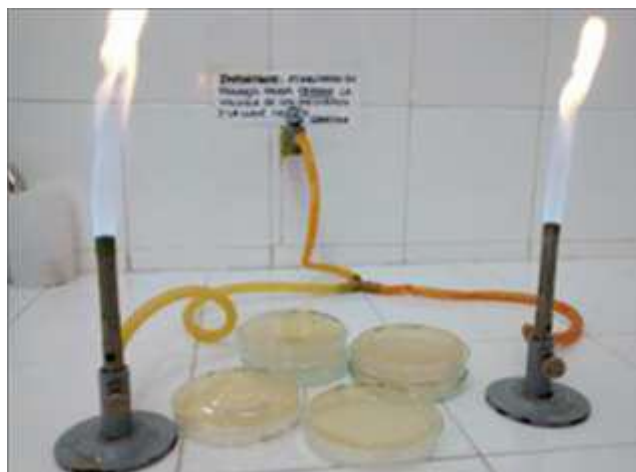
Anexo 5. Filtración de las muestras de agua mineral



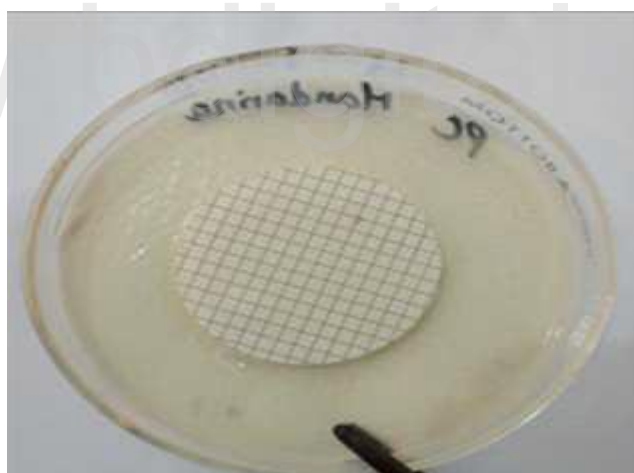
Anexo 6. Obtención de la membrana millipore luego de la filtración de la muestra



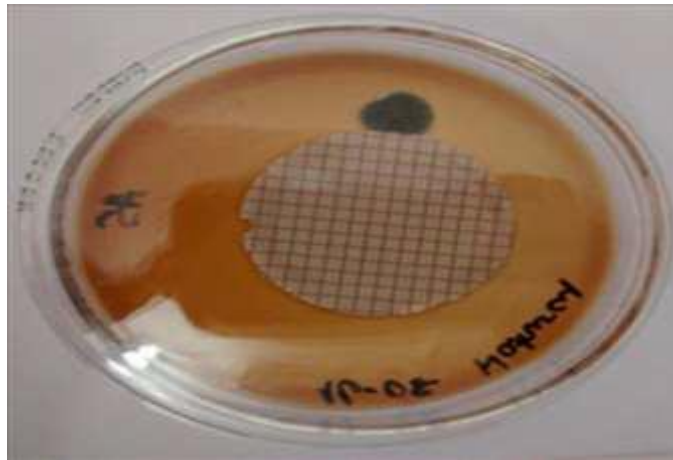
Anexo 7. Membrana de filtración Millipore sembrada con las muestra en agar plate Count



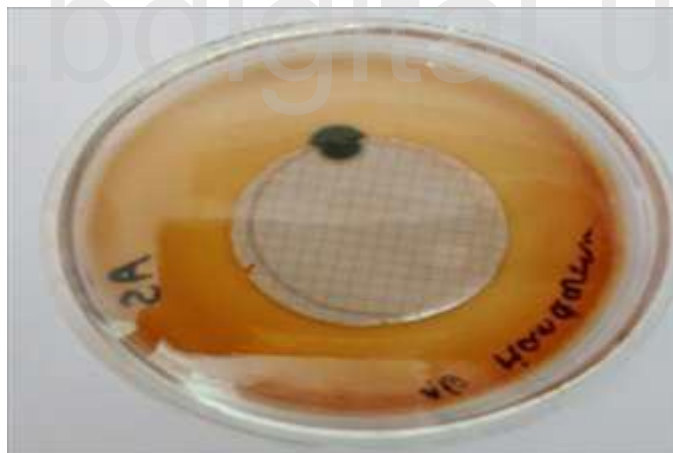
Anexo 8. Placas de agar Plate count sembradas



Anexo 9. Crecimiento de BAM en la muestra de agua mineral sabor mandarina



Anexo 10. Crecimiento de hongos de la muestra de agua mineral natural en agar saboraud



Anexo 11. Crecimiento de mohos en la muestra de agua mineral sabor a mandarina en agar Saboraud