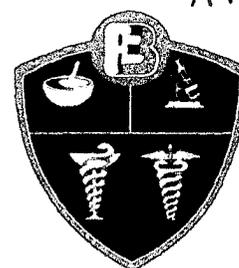




UNIVERSIDAD
DE LOS ANDES
MERIDA-VENEZUELA

Universidad de Los Andes
Facultad de Farmacia y Bioanálisis
Postgrado en Microbiología mención Alimentos
Mérida - Venezuela



QR105
A7

**MICROBIOTA BACTERIANA HETEROTROFA AEROBIA MESOFILA DEL
AGUA ENVASADA**

www.bdigital.ula.ve

Autora

Farmacéutica Judith Araque Rangel

Tutor

Dr. Gerardo Medina

Enero, 2014

Atribución - No Comercial - Compartir Igual 3.0 Venezuela
(CC BY - NC - SA 3.0 VE)



UNIVERSIDAD
DE LOS ANDES
MERIDA-VENEZUELA

Universidad de Los Andes
Facultad de Farmacia y Bioanálisis
Postgrado en Microbiología mención Alimentos
Mérida - Venezuela



**MICROBIOTA BACTERIANA HETEROTROFA AEROBIA MESOFILA DEL
AGUA ENVASADA**

www.bdigital.ula.ve

Trabajo de grado como requisito parcial para optar al título de
Magister Scientiae en Microbiología mención Alimentos

Autora

Farmacéutica Judith Araque Rangel

Tutor

Dr. Gerardo Medina

Enero, 2014

Primeramente quiero dedicar este esfuerzo **a mi Dios**, quien años atrás también dedico su esfuerzo por mí y no solo su esfuerzo sino su vida, al morir por mí en la cruz del calvario. Él es quien me ha dado todo y me ha hecho ser quien soy (1 Corintios 15:10), por El y para El, culmino esta etapa de mi vida académica

A mis queridos PADRES, Eldis y María; quienes con mucho cariño, amor y ejemplo han hecho de mí una persona con valores para poder desenvolverme como: ESPOSA, MADRE Y PROFESIONAL.

A mi **ESPOSO, Félix Andueza**; a él especialmente le dedico esta Tesis. Por su paciencia, por su comprensión, por su empeño, por su fuerza, por su amor, por ser tal y como es, ... porque lo quiero. Es la persona que más directamente ha sufrido las consecuencias del trabajo realizado. Realmente el me llena por dentro para conseguir un equilibrio que me permita dar el máximo de mí. Gracias por hacerme ver que nuestras metas solo son posibles si nos esforzamos y trabajamos duro cada día para alcanzarlas.

A mi **HIJO, Félix Daniel**, por ser el ángel de mi vida, mi mayor inspiración y mi gran felicidad. Eres el motivo y la razón que me ha llevado a seguir superándome día a día, para alcanzar mis más apreciados ideales de superación. Es sin duda mi referencia para el presente y para el futuro.

A mis hermanos, **Eldis, Argenis y Jorge**. Mis sobrinos y sobrinas, **Eldis, Argenis José, Mariel, María de los Ángeles, Emily, María Mayela, María Daniela y Rafael Antonio**. Los quiero mucho.

AGRADECIMIENTOS

A **Dios Todopoderoso**, por ser mi roca fuerte, la luz que me guía y el sostén que me mantiene de pie ante la vida. Por trazar el camino por los que mis pies avanzan y en el que mi mente y corazón viven la felicidad

Al **Dr. Gerardo Medina**, sus conocimientos, su persistencia, su paciencia y su motivación han sido fundamentales para mi formación como investigadora. Muchísimas Gracias!

Especial reconocimiento merece el interés mostrado por mi trabajo y las sugerencias recibidas de las profesoras y amigas **Ana Carolina González "Carolinita"** y **Evelyn Alvarez**, quienes me brindaron sus conocimientos y experiencias profesionales desde el primer momento. Muchas gracias, me encuentro en deuda con ustedes por el ánimo infundido y la confianza en mí depositada.

Gracias a mis queridos compañeros de trabajo **Soumi, Vanessa, Carolina Mata, Nol, Clody, Coromoto, Ormary, Johan, Jhonny, Urbano, Nelson, Reina Zolano**, los aprecio y les estoy muy agradecida, por brindarme su apoyo, amistad y confianza en todo momento y, por último pero no menos importante, a **Sulay**, por la paciencia, complicidad y gran apoyo en todo el proceso de elaboración de la Tesis, Gracias Hermana. Dios les bendiga.

A **Alba**, que desde un principio hasta el día hoy me diste ánimo para terminar esta etapa. Lo logramos!

Al **Dr. Valmore Guerrero**, por sus acertados comentarios y consejos durante la revisión del presente trabajo. Agradecida.

También me gustaría agradecer los consejos recibidos a lo largo de los últimos años por profesores amigos de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, que de una manera u otra han aportado su granito de arena a mi formación. Destacar al **Dr. Andrés León Leal, Dr. Pablo Djabayan, Dra. Laura Calderón, Dra. Celina Pérez de Salazar, Dra. Ángela Lugo, Dra. Elsa Velazco y a la Dra. María Alejandra Blanco**. Gracias por el apoyo y el ánimo que me brindaron.

Al **Prof. Zarack Chacón Rueda**, gracias amigo por siempre estar pendiente de cómo iba la tesis.

Al Consejo de Desarrollo Científico Humanístico, Tecnológico y de las Artes de la Universidad de Los Andes (CDCHTA-ULA) Proyecto N° FA-432-08-03-A y al Ministerio del Poder Popular para Educación Universitaria, Ciencia y Tecnología (MPPEUCT), a través del Observatorio Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (ONCTI) Proyecto N° 2011001283, por el financiamiento aportado, sin los cuales no habría podido cumplir este reto.

Y no me puedo terminar sin antes decirles, que sin ustedes a mi lado no lo hubiera logrado, tantas desveladas sirvieron de algo y aquí está el fruto. Les agradezco a todos ustedes con toda mi alma el haber llegado a mi vida y el compartir momentos agradables y momentos tristes, pero estos momentos son los que nos hacen crecer y valorar a las personas que nos rodean. Los quiero mucho y nunca los olvidare.

Judith

www.bdigital.ula.ve

INDICE

	Página
1. Introducción.....	2
2. Marco Teórico.....	9
2.1. El Agua	9
2.2. El agua y la salud.....	12
2.3. El agua: Protección y conservación.....	17
2.4. Las aguas minerales	22
2.4.1. Origen de las aguas minerales	23
2.4.2. Clasificación de las aguas minerales.....	24
2.4.3. Características físico químicas.....	27
2.4.4. Características microbiológicas.....	31
2.5. Las aguas minerales envasadas	33
2.5.1. Historia	33
2.5.2. Clasificación de las aguas minerales envasadas....	35
2.5.3. Características microbiológicas.....	37
2.5.4. Proceso de envasado	40
2.5.5. Reglamentación.....	43
2.5.6. Perspectivas.....	45
3. Hipótesis.....	48
4. Objetivos.....	49
4.1. Objetivo general.....	49
4.2. Objetivos específicos.....	49
5. Materiales y Métodos.....	50
5.1. Materiales.....	50
5.1.1. Muestras.....	50
5.1.2. Medios de cultivo.....	50
5.1.3. Reactivos.....	50
5.2. Métodos	51
5.2.1. Determinación del pH, la temperatura y tratamiento	

de la muestra.....	51
5.2.2. Cuantificación, recuento, aislamiento e identificación de microorganismos.....	51
• Cuantificación y aislamiento de bacterias heterótrofas mesófilas viables.....	51
• Recuento y aislamiento de Coliformes totales y fecales	51
• Detección y aislamiento de <i>Staphylococcus aureus</i>	52
• Detección y aislamiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	52
5.2.3. Identificación de bacterias heterótrofas	52
• Tinción de Gram	53
• Morfología de las colonias y producción de pigmento	53
• Producción de oxidasa.....	53
• Producción de catalasa	53
• Oxidación-fermentación de la glucosa	54
• Tipo respiratorio	54
• Observación de la movilidad	54
5.2.3.1. Identificación de bacilos Gram negativos fermentadores	54
• Siembra en medio Kligler	55
• Producción de indol	55
• Producción de acetil-metil-carbinol (Voges-Proskauer)	55
• Prueba del rojo de metilo	55
• Utilización de citrato	56
• Producción de ureasa	56
• Desanimación de la fenilalanina	56

• Reducción de nitratos	56
• Producción de gas de la lactosa	57
• Hidrólisis de la esculina	57
• Crecimiento en agar McConkey	57
• Galerías API 20E	57
5.2.3.2. Identificación de bacilos Gram negativos no fermentadores	58
• Producción de pigmentos	58
• Crecimiento a 42°C	58
• Hidrólisis de la esculina	58
• Producción de ureasa	59
• Desnitrificación de nitratos	59
• Galerías API 20NE	59
5.2.3.3. Identificación de bacilos Gram positivos.	59
• Observación de la morfología y posición de la espora	59
• Hidrólisis del almidón	60
• Hidrólisis de la gelatina	60
• Galerías API Coryne	60
5.2.3.4. Identificación de cocos Gram positivos	60
• Crecimiento en agar sangre	61
• Hidrólisis del Hípurato	61
• Prueba de Bilis esculina	61
• Prueba de la coagulasa	61
5.2.4. Criterios de clasificación	62
5.2.5. Identificación molecular de cepas bacterianas....	62
5.2.6. Determinación de perfiles de resistencia antimicrobiana	65
5.2.7. Tratamiento estadístico de los resultados	65
5. Resultados	66

6. Discusión	86
7. Conclusiones	104
8. Bibliografía	107

www.bdigital.ula.ve

INDICE DE TABLAS

	PAGINA
TABLA 1: Valores descriptivos globales del numero de bacterias heterótrofas aerobias mesófilas por marca de agua envasada analizada	67
TABLA 2: Valores descriptivos globales del numero de coliformes totales por marca de agua envasada analizada	69
TABLA 3: Valores descriptivos globales del numero de coliformes fecales por marca de agua envasada analizada	71
TABLA 4: Valores descriptivos globales del numero de <i>Pseudomonas spp</i> por marca de agua envasada analizada	73
TABLA 5: Tipos de bacterias heterótrofas aerobias aisladas (numero de aislados) en cada marca de agua envasada analizada según su morfología	75
TABLA 6: Géneros de bacterias aisladas (Nº y % de cepas)	77
TABLA 7: Especies de bacterias heterótrofas aerobias mesofilas aisladas de agua envasada	80
TABLA 8: Resultados de la identificación molecular de cepas bacterianas aisladas de muestras de agua envasadas...	81
TABLA 9: Perfiles de resistencia antimicrobiana de especies de bacilos Gram negativos no fermentadores aislados de aguas envasadas	81
TABLA 10: Perfiles de resistencia antimicrobiana de especies de bacilos Gram negativos fermentadores aislados de aguas envasadas	82
TABLA 11: Perfiles de resistencia antimicrobiana de especies de cocos Gram positivos aislados de aguas envasadas	83

INDICE DE FIGURAS

		PAGINA
FIGURA 1a:	Valores promedios del numero de bacterias heterótrofas aerobias mesófilas por marca de agua envasada analizada	68
FIGURA 1b:	Valores promedios del numero de bacterias heterótrofas aerobias mesófilas por marca de agua mineral envasada analizada (Escala logarítmica)	68
FIGURA 2a:	Valores promedios del numero de coliformes totales por marca de agua envasada analizada	70
FIGURA 2b:	Valores promedios del numero de coliformes totales por marca de agua envasada analizada (Escala logarítmica)	70
FIGURA 3a:	Valores descriptivos globales del numero de coliformes fecales por marca de agua envasada analizada	72
FIGURA 3b:	Valores promedios del numero de coliformes fecales por marca de agua envasada analizada (Escala logarítmica)	72
FIGURA 4:	Valores descriptivos globales del numero de <i>Pseudomonas spp</i> por marca de agua envasada analizada	74
FIGURA 5:	Tipos de bacterias heterotróficas aerobias aisladas	76
FIGURA 6:	Géneros de bacterias aisladas (Nº y % de cepas)	77
FIGURA 6a:	Géneros de bacterias Gram negativas fermentadoras aisladas de aguas envasadas	78
FIGURA 6b:	Géneros de bacterias Gram negativas no fermentadoras aisladas de aguas envasadas	78
FIGURA 6c:	Géneros de cocos Gram positivos aisladas de aguas envasadas	79

INDICE

	Página
1. Introducción.....	2
2. Marco Teórico.....	9
2.1. El Agua	9
2.2. El agua y la salud.....	12
2.3. El agua: Protección y conservación.....	17
2.4. Las aguas minerales	22
2.4.1. Origen de las aguas minerales	23
2.4.2. Clasificación de las aguas minerales.....	24
2.4.3. Características físico químicas.....	27
2.4.4. Características microbiológicas.....	31
2.5. Las aguas minerales envasadas	33
2.5.1. Historia	33
2.5.2. Clasificación de las aguas minerales envasadas...	35
2.5.3. Características microbiológicas.....	37
2.5.4. Proceso de envasado	40
2.5.5. Reglamentación.....	43
2.5.6. Perspectivas.....	45
3. Hipótesis.....	48
4. Objetivos.....	49
4.1. Objetivo general.....	49
4.2. Objetivos específicos.....	49
5. Materiales y Métodos.....	50
5.1. Materiales.....	50
5.1.1. Muestras.....	50
5.1.2. Medios de cultivo.....	50
5.1.3. Reactivos.....	50
5.2. Métodos	51
5.2.1. Determinación del pH, la temperatura y tratamiento	

de la muestra.....	51
5.2.2. Cuantificación, recuento, aislamiento e identificación de microorganismos.....	51
• Cuantificación y aislamiento de bacterias heterótrofas mesófilas viables.....	51
• Recuento y aislamiento de Coliformes totales y fecales	51
• Detección y aislamiento de <i>Staphylococcus aureus</i>	52
• Detección y aislamiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	52
5.2.3. Identificación de bacterias heterótrofas	52
• Tinción de Gram	53
• Morfología de las colonias y producción de pigmento	53
• Producción de oxidasa.....	53
• Producción de catalasa	53
• Oxidación-fermentación de la glucosa	54
• Tipo respiratorio	54
• Observación de la movilidad	54
5.2.3.1. Identificación de bacilos Gram negativos fermentadores	54
• Siembra en medio Kligler	55
• Producción de indol	55
• Producción de acetil-metil-carbinol (Voges-Proskauer)	55
• Prueba del rojo de metilo	55
• Utilización de citrato	56
• Producción de ureasa	56

MICROBIOTA BACTERIANA HETEROTROFA AEROBIA MESOFILA DEL AGUA ENVASADA

Farmacéutica Judith Araque Rangel. Universidad de los Andes, Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Edif. De Microbiología y Parasitología. Laboratorio de Microbiología del Agua. Mérida, Venezuela. Email judara2110@hotmail.com

El agua mineral envasada no es un producto estéril, presenta una microbiota autóctona diversa que depende de las características biológicas, ecológicas, geológicas y fisicoquímicas. En este sentido, se realizó el presente trabajo cuyo objetivo fue conocer los principales grupos bacterianos que conforman la microbiota bacteriana heterótrofa aerobia mesófila del agua mineral envasada que se expenden y comercializan en las principales ciudades de Venezuela, así como los patrones de resistencia a los antimicrobianos de las principales especies de esta población de bacterias. Se logró detectar la presencia de bacterias heterótrofas aerobias mesófilas en un número bajo, en un rango entre 11 UFC/100 ml a > 2000 UFC/100 ml, con valores promedios entre 11 y 1016,5 UFC/100 ml. Los coliformes totales y fecales estuvieron presentes en 20 de las 38 marcas de agua analizadas con valores entre 3 UFC/100 ml a >2000 UFC/100 ml, y entre 2 UFC/100 ml a >2000 UFC/100 ml, respectivamente. La presencia de células de *Pseudomonas aeruginosa* fue constatada, encontrando valores entre 1 a 31 UFC/100 ml, con valores promedios entre 2,5 y 21,5 UFC/100 ml. Se lograron aislar un total de 268 colonias, lográndose identificar 214 (79,90 %), correspondiendo 174 (64,93%) a bacterias Gram negativas, y 40 (14,93%) a bacterias Gram positivas. No se pudieron identificar 54 (20,15 %) colonias. Se pudo identificar un total de 24 géneros bacterianos, correspondiendo 14 (58,33 %) a bacilos Gram negativos fermentadores, 7 (29,20 %) a bacilos Gram negativos no fermentadores y 3 (12,50 %) a cocos Gram positivos. De las 214 colonias aisladas se pudieron identificar e incluir en 46 especies, siendo las especies de mayor frecuencia de aislamiento *Pseudomonas aeruginosa* (19,16 %), *Escherichia coli* (6,54 %), *Kocuria rosea* (6,10 %), *Staphylococcus aureus* (4,67 %), *Aeromonas hydrophila* (3,74 %) y *Rhanella aquatilis* (3,27 %). Se obtuvieron en la mayoría de colonias identificadas perfiles de multiresistencia a diversos antibióticos. Las aguas minerales envasadas que se consumen en Venezuela poseen una microbiota bacteriana heterótrofa aerobia mesófila asociada, de la cual se puede deducir su calidad sanitaria, que en el caso del presente estudio pone de manifiesto la presencia de problemas de tipo higiénicos, con presencia de bacterias potencialmente patógenas y con perfiles de multiresistencia asociados.

Palabras claves: Agua envasada, microbiota, multiresistencia antibióticos

1. INTRODUCCIÓN

Las ventas de agua mineral envasada a nivel mundial se han quintuplicado en los últimos años, representando un mercado que moviliza más de ciento veinte mil millones de litros de agua, con ganancias superiores a los cincuenta mil millones de dólares anuales (Herraiz, 2006; Da Cruz, 2006; López, 2006, Royte, 2009; Dege, 2011; Instituto Uruguay XXI, 2011; Maegan, 2012). La razón de este comportamiento la encontramos en la creencia de que el agua de los acueductos presenta contaminantes químicos y microbiológicos, y además, por el hecho de que en algunas ocasiones el agua de los grifos presenta sabores, colores, olores extraños y sedimentos (Tampo, 2004; Doria, 2006; Gleick, 2010; Hu y col., 2011; Queiroz y col., 2012).

La infraestructura para la distribución del agua potable en Venezuela esta bien desarrollada, sin embargo, la falta de mantenimiento de la red de distribución permite que el agua pueda albergar contaminantes de origen químico y microbiológico, así como olores y sabores desagradables en algunas zonas del país. Por esta razón, y por el hecho de la presencia en Venezuela de tendencias que ponen de relieve en la sociedad la moda del consumo de agua mineral envasada, se ha venido observando un sostenido aumento en el consumo de agua mineral envasada en nuestra nación (OPS-WHO, 1998, Jouravlev, 2004; Andueza, 2009; Iriarte, 2009; Carvajal y Oletta, 2012).

En un estudio realizado por el Servicio de Comercio Exterior de los Estados Unidos de Norteamérica, se señala que la demanda por el agua mineral envasada en Venezuela ha ido creciendo vertiginosamente en los últimos años. Se ha estimado que el mercado global del agua mineral envasada en Venezuela ronda los 340 millones de litros por año, experimentado una tasa de crecimiento en los últimos años del 15 al 20 %. Sin embargo, el mercado venezolano es todavía pequeño si lo comparamos con el mercado Europeo donde la tasa de consumo de agua mineral es del orden de 150 litros per capita por año, mientras que en Venezuela el consumo oscila entre 6 a 8 litros per capita por año (Foreign Commercial Service, 2003; Herraiz, 2006).

En relación a los riesgos que puede representar para la salud el consumo de agua mineral envasada, se deben tener en mente dos aspectos. Primero, la posibilidad de que el agua pueda estar contaminada con microorganismos patógenos o sustancias tóxicas, y segundo, que la microbiota autóctona pueda causar enfermedad en poblaciones de mayor susceptibilidad a las infecciones como lo son niños, ancianos e inmuno suprimidos (Delabroise y Ducluzeau, 1974; Macerata y col., 1988; Havelaar y col., 1990; Hunter y col., 1990; Richards y col., 1992; Hunter, 1993; Lecler, 1994; Levesque y Gauven, 1994; Edberg y col., 1997; Fujikawa y col. 1997; Daschner, 1998; Wilkinson y Kerr, 1998; Cabral y Fernández, 2002; Egli y col., 2002; Leclerc y Moreau, 2002; Allen y col., 2004; Edberg y Allen, 2004, Pepper y col., 2004; Leoni y col., 2005; Eckmanns y col., 2008; Oie y col., 2008; Zamberlan y col., 2008; Naze y col., 2010; Al-Quadiri y col., 2011).

Las aguas minerales envasadas no son estériles y poseen una población microbiana que depende básicamente de sus condiciones fisicoquímicas, ambientales y ecológicas. Las condiciones ecológicas son similares a las de las aguas subterráneas e, incluso, al agua de mar ya que todas ellas son aguas oligotróficas muy pobres en nutrientes (De la Rosa y Mosso, 2000; Chapelle, 2001; Leclerc y Da Costa, 2004).

Según Schmidt-Lorenz (1976), la microbiota de un agua mineral envasada está constituida por dos tipos de microorganismos, muy diferentes en origen y en propiedades, que coexisten: Los llamados autóctonos, que son los propios del hábitat y que constituyen la microbiota natural, y los alóctonos procedentes de otro hábitat (suelo, heces, vegetales, maquinarias, etc.) y que se consideran contaminantes ocasionales.

El agua mineral tomada directamente de los manantiales tiene pocas bacterias, menos de 100 unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml), que se multiplican y persisten indefinidamente en el agua. Sin embargo, luego de su envasado esta población sufre un aumento llegando a niveles de 10^5 UFC/ml en pocas semanas luego del envasado (Hammes y col., 2010).

Diversos investigadores han venido alertando sobre el riesgo que representa para la salud pública el consumo de agua mineral envasada en países desarrollados (Blake y col., 1977; Craun, 1986; Hunter y Burge, 1987; Hernández-Duquino y Rosenberg, 1987; Pavia, 1987; Biziago y col., 1988; Rosenberg y Hernández-Duquino, 1989;; Bischofberger y col., 1990; Rosenberg, 1990; Walker, 1992; Warburton y col., 1992; Massa y col., 1995; Stelz, 1997; Warburton y col., 1998; Evandri y col., 2000; Mary y col., 2000; Theron y Cloete, 2002; Rosenberg, 2003; Messi y col., 2005; Varga, 2011; Falcone-Díaz y col., 2012; Queiroz y col., 2012).

Se ha documentado un brote epidémico por agua mineral envasada: la epidemia de cólera que tuvo lugar en Portugal, en 1974. En ella se demostró que 82 personas habían consumido una misma agua mineral envasada y que el manantial había sido contaminado con *Vibrio cholerae* desde un pueblo cercano por filtraciones del acuífero (Blake y col., 1977).

También se han relacionado casos de diarrea del viajero con el consumo de agua envasada (Pavia, 1987), y en los últimos años, se han asociado con infecciones nosocomiales en centros asistenciales (Naze y col., 2010).

Algunas de las especies de especies bacterianas de los géneros *Pseudomonas*, *Brevundimonas*, *Burkholderia*, *Chryseomonas*, *Comamonas*, *Ochrobactrum*, *Legionella*, *Stenotrophomonas* y *Aeromonas*, aisladas en este tipo de agua, han sido clasificadas como patógenos oportunistas en niños, ancianos y personas inmuno suprimidas (Costa y col., 2005; Leoni y col., 2005; Oie y col., 2008; Naze y col., 2010).

De igual forma, diversos autores han demostrado la resistencia a los antibióticos de cepas de bacterias autóctonas de aguas minerales envasadas lo cual es preocupante desde el punto de vista de la salud pública (Messi y col., 2005; Falcone-Días y col., 2012; Vaz-Moreira y col., 2012).

En el caso de los países en vías de desarrollo, la información sobre la calidad sanitaria de las aguas minerales envasadas ha venido aumentando. En muchos

países se conoce que la calidad sanitaria es deficiente y que pueden llegar a ser una fuente importante de microorganismos potencialmente patógenos, causantes de una gran variedad de infecciones microbianas (Mavridou, 1992; Ogan, 1992; Mavridou y col., 1994; Andueza, 2000; Nascimento y col., 2000; Gomezacaceres y col., 2001; Franco y Cantusio, 2002; Criado y col., 2005; Jeena y col., 2006; Venieri y col., 2006; Ojo y col., 2007; Yamaguchi y col., 2007; Resende y Nunes, 2008; Addo y col., 2009; Vidal y col., 2009; Naze y col., 2010; Oyedeji y col., 2010; Al-Qadiri y col., 2011; Islam y col., 2011; Kamruzzaman y col., 2011; Venturini y col., 2011; Falcone-Días y col., 2012; Herath y col., 2012; Queiroz y col., 2012; Gangil y col., 2013; Momtaz y col., 2013).

En relación a la microbiota, la información disponible es muy escasa, por lo que se desconoce la biodiversidad y la composición de la población microbiana de estas aguas en la mayoría de los países, tanto en los llamados en vías de desarrollo, como en los desarrollados (Dewettinck y col., 2001; Loy y col., 2005; Andueza, 2009; Burtscher y col., 2009; Casanovas-Massana y Blanch, 2012; De Roy y col., 2012).

Por todo lo antes señalado se considera como un aspecto fundamental de la calidad del agua de bebida envasada, su población microbiana o microbiota. Desde el punto de vista cuantitativo, las aguas con bajos niveles de microorganismos son de mejor calidad sanitaria que aquellas que presentan altas cantidades. Cuando se trata de microorganismos patógenos, su presencia, incluso si se encuentran en pequeñas cantidades, no es permitida (Leclerc y Da Costa, 2004).

Puesto que dentro de la población que consume agua mineral envasada se pueden encontrar niños, personas enfermas y personas ancianas con problemas crónicos de salud y con un sistema inmunológico comprometido, es importante conocer la calidad sanitaria, la composición de la microbiota bacteriana y la posible presencia de bacterias patógenas en el agua mineral envasada, de manera de evitar posibles brotes de enfermedades infecciosas (Edberg y Allen, 2004; Leclerc y Da Costa, 2004; Oie y col., 2008).

Por otra parte, la comunidad científica internacional ha venido desarrollando estudios tendientes a conocer la microbiota bacteriana autóctona de diversos ecosistemas, incluyendo el cuerpo humano, así como de los principales alimentos, entre ellos el agua, de manera de poder entender la biología, dinámica e importancia de estos organismos dentro de cada uno de estos ecosistema (Peterson y col., 2009; Rudi y col., 2009; Solt y col., 2011; Casanova y col., 2012).

En Venezuela, al igual que el resto de países, los estudios sobre la microbiología del agua mineral envasada se han enfocado en la determinación de la calidad sanitaria y la presencia de bacterias patógenas (Novoa, 1989; Andueza, 2000; Silva y col., 2004; Andueza, 2009; Iriarte, 2009; Carvajal y Oletta, 2012), desconociéndose aun la composición de la microbiota bacteriana característica de cada una de las marcas que se envasan y comercializan en el país.

Conocer la microbiota asociada de un producto como el agua mineral envasada en una región geográfica, también tiene una repercusión económica y comercial. No solo porque indica la calidad microbiológica y por ende su riesgo sanitario, si no porque permite obtener la denominación de origen, criterio este de mucha importancia en los últimos años para la comercialización de los productos y su valor en el mercado (Esquerre, 2008; Urbina y Alvarez, 2012).

Otro aspecto involucrado en el estudio de la microbiota asociada al agua mineral envasada, es el conocimiento, protección y utilización de la biodiversidad microbiana. Entendiéndose como biodiversidad microbiana el conjunto de géneros, especies y cepas microbianas presentes en un ecosistema dado, en un tiempo determinado y que es único y característico del mismo (Atlas y Bartha, 2006).

En los últimos años, como consecuencia del cambio climático, se ha dado mucha importancia a los estudios de biodiversidad y su impacto en los ecosistemas, en estos estudios se han utilizado los índices de biodiversidad, en principio de la fauna y de flora, de manera de conocer como el cambio climático está influyendo

en la disminución de la riqueza de especies y su abundancia. Sin embargo, los estudios de biodiversidad microbiana han quedado rezagados, obviando su importancia como reguladora de los ciclos biogeoquímicos y desconociendo que es uno de los elementos más sensibles a los cambios climáticos, dentro de los niveles tróficos de un ecosistema (Perlmutter y Rothstein, 2011; Eaton y col., 2012; Giovannoni y Vergin, 2012).

Otro aporte importante de estudiar la microbiota de las aguas minerales envasadas es la posible presencia dentro de esta biodiversidad microbiana, de organismos productores de sustancias con interés industrial con potenciales aplicaciones en la industria de los alimentos, cosmética y farmacéutica (Albert, 1999; Melgarejo y col., 2002; Atlas y Bartha, 2006; Madigan y col., 2010; Velez, 2011).

Por último, en las últimas décadas la comunidad científica internacional ha dado mucha importancia a los estudios de los microorganismos en los diferentes hábitats, entre ellos los acuáticos, puesto que entendiendo su estructura, funcionamiento y biodiversidad, podemos conseguir una mejor comprensión de los procesos de adaptación y evolución de la vida sobre la tierra.

De manera de resumen se puede señalar que los estudios microbiológicos sobre el agua mineral envasada, permitirán ayudar a dar respuestas a los distintos problemas que se han detectado en este tipo de productos en los últimos años, como lo son:

1. Altos contajes en el número de bacterias heterótrofas (Warburton y col., 1986; Warburton, 1993; Andueza, 2000; Warburton, 2000; Pepper y col., 2004; Venieri y col., 2006; Zamberlan y col., 2008, Vidal y col., 2009; Islam y col., 2011; Venturini y col., 2011).
2. Presencia de bacterias patógenas (Blake y col., 1977; Nicoletti y Russo, 1979; Leclerc y Moriamez, 1980; Leclerc y col., 1985; Manaia y col., 1990; Craun y col., 1996; Jayasekara y col., 1998; Legnani y col., 1999; Massa y col., 2001;

Biscardi y co., 2002; Villari y col., 2003; Eckmanns y col., 2008; Iriarte, 2009; Naze y col., 2010; Al-Quadiri y col., 2011).

3. **Amplios patrones de resistencias antimicrobianas entre las bacterias aisladas de este tipo de agua (Hernández-Duquino y Rosenberg, 1987; Kailis y col., 1991; Mavridou, 1992; Guillot y Leclerc, 1993; Massa y col., 1995; Vachee y col., 1997; Mary y col., 2000; Urmeneta y col., 2000; Messi y col., 2005; Vaz-Moreira y col., 2012).**
4. **Contaminación fúngica (Cabral y col., 2002; Yamaguchi y col., 2007).**
5. **Desconocimiento de la población de microorganismos viables no cultivables (Rappe y Giovannoni, 2003; Andueza, 2009).**
6. **Falta de estudios donde se caracterice la biodiversidad de la población microbiana (microbiota) presente en cada marca de agua (Leclerc y Moreau, 2002; Andueza, 2009).**
7. **Obtención de cepas de interés industrial y biotecnológico**

Considerando lo antes expuesto se propuso como objetivo principal, del presente trabajo, conocer los principales géneros y especies que conforman la microbiota bacteriana heterótrofa aerobia mesófila asociada a las aguas minerales envasadas de consumo en el país, de manera de poder establecer posibles riesgos sanitarios asociados a la población microbiana presente.

2. MARCO TEORICO

2.1. EL AGUA

Se puede definir el agua como una sustancia química resultante de la combinación de dos átomos de hidrogeno y uno de oxigeno, cuya formula química es H₂O (Lafuente y col., 2000).

Entre los principales factores fisicoquímicos que caracterizan el agua tenemos: Turbidez, densidad, punto de ebullición, punto de congelación, color, sabor, olor, temperatura, pH, dureza y conductividad eléctrica. Los valores de estas características van a depender de los diferentes compuestos orgánicos e inorgánicos disueltos, así como su contenido aniónico y catiónico, los cuales le dan características especiales a las aguas permitiendo establecer la calidad y uso de las mismas (Lafuente y col., 2000).

De manera general podemos clasificar el agua presente en el planeta en dos tipos, el agua salada y el agua dulce. La tierra está constituida, en sus tres cuartas partes por agua, siendo la mayoría agua salada (97%) y sólo el 3% es agua dulce, apropiada para el consumo humano, y de ella más de tres cuartas partes se hallan retenidas en los glaciares y el hielo polar, muy lejos del alcance de las técnicas actuales de explotación. Casi todo el resto subyace en acuíferos subterráneos que no se utilizan, en su mayoría. Las principales fuentes de suministro de agua proceden de aguas superficiales, ríos, lagos y embalses que sólo representan un 1% del total de agua dulce. Se calcula que las reservas mundiales de agua dulce en la Tierra superan los 37 millones de Km³, pero su mayor parte resulta inaccesible para la humanidad y el agua disponible está distribuida irregularmente, según los lugares y las estaciones del año (UNEPGEMS, 2008; Kingsolver, 2010).

Aunque el mar cubra gran parte de la tierra, esta depende del agua dulce. Los lagos, embalses, ríos, a pesar de que ocupan una mínima parte de la superficie de los continentes, mantienen una biodiversidad muy elevada y son la fuente del

agua dulce para todos los organismos no marinos. Es en estos ecosistemas donde la confrontación entre el uso del agua por el hombre frente a la conservación del recurso, se hace cada vez más patente (Kingsolver, 2010).

El ciclo hidrológico es la base del funcionamiento de todos los ecosistemas continentales. La evaporación del agua es el origen de la lluvia de la cual depende tanto la producción vegetal como la esorrentía superficial que alimentará ríos, lagos, manantiales y acuíferos. El agua de la lluvia puede escurrirse rápidamente hacia los cursos fluviales que la recogen, infiltrarse en el sustrato o evaporarse directamente. El agua de lluvia proviene de la condensación del agua que se evapora en el mar y sobre los continentes. Esta evaporación es posible gracias a la energía que proviene de sol; casi una cuarta parte de toda la energía solar es usada en la evaporación del agua. La mayor parte del agua de lluvia cae en el mar. De la que cae en los continentes y circula por los ríos casi dos terceras partes se evapotranspiran (evaporación directa o transpiración por las plantas) mientras que el resto circula desde la montañas por los ríos y lagos, puede quedar temporalmente almacenada en acuíferos y al final va a parar al mar. Este viaje lo hacen cada año unos 40.000 Kilómetros cúbicos de agua y forman tanto la base de la vida en los ecosistemas acuáticos como de los recursos usados por el hombre (Margalef, 1983; Atlas y Bartha, 2006).

Los organismos que viven en el agua han evolucionado en ella desde el principio del origen de la vida en la tierra. Probablemente la vida se originó en el agua y durante millones de años, mientras los continentes tenían poca diversidad, el mar estaba lleno de vida. Las aguas dulces representan una parte minúscula de toda el agua del planeta, pero albergan una diversidad proporcionalmente mucho mayor que el mar si comparamos las extensiones relativas (Margalef, 1983; Allan, 1995; Atlas y Bartha, 2006; UNEPGEMS, 2008).

Los diferentes factores que afectan los ecosistemas acuáticos hacen que algunos organismos desaparezcan mientras otros sean más abundantes. Dependiendo de la tolerancia a esos factores, en el agua tendremos diferentes comunidades indicadoras (Atlas y Bartha, 2006).

Por otra parte, y desde el punto de vista del ser humano, el agua es un elemento esencial para la vida, representa aproximadamente un 60% del peso corporal total, el cual viene regulado a través del equilibrio entre el ingreso (alimentos, bebidas, productos metabólicos) y el egreso (sudor, respiración, heces, orina). Se puede decir que el agua dio origen a la vida y la mantiene y regula (Ambroggi, 2001).

El agua ha sido un elemento clave para el desarrollo de la humanidad; su presencia ha permitido el desarrollo de civilizaciones que mantuvieron una permanente disputa con la naturaleza y entre sí para controlar la disponibilidad del agua en el lugar y en el momento necesario, así como para evitar los devastadores efectos de sus excesos (UNESCO, 2003; Andreazzi y col., 2007).

En la actualidad el agua plantea problemas de dimensiones múltiples y de gran impacto, por los crecientes usos y consumos en los ámbitos agrícola, industrial y terciario, particularmente el doméstico familiar, con efectos muy importantes en la calidad de vida de las personas (Andreazzi y col., 2007; UNEPGEMS, 2008).

De acuerdo a datos de la Organización mundial para la salud, se estima que unos 1.200 millones de personas, casi el 20% de la población mundial, no tienen acceso al agua potable. Un 40% no tiene acceso al saneamiento de aguas, con las consiguientes enfermedades que conlleva no disponer de agua corriente (WHO, 2009).

Las Naciones Unidas, en sus Objetivos de Desarrollo del Milenio (ODM), se han fijado un objetivo para el 2015 que consiste en reducir a la mitad el número de personas sin acceso a un suministro de agua segura. Este objetivo se amplió para incluir el tema del saneamiento doméstico durante la Cumbre de la Tierra en Johannesburgo (UNEPGEMS, 2008).

El porcentaje de personas en América Latina y el Caribe que no tienen acceso al agua es aproximadamente 15%; en Asia 20% y en África 40%. El déficit en saneamiento para estas regiones son, respectivamente, 20%, 50% y 40%.

Además, se debe recordar que la población crecerá durante los próximos 25 años y, en particular, se espera que la población urbana de África y de Asia se duplique (Pruss-Ustun y col., 2008; WHO, 2011).

La conservación, distribución, utilización, reciclaje y accesibilidad del agua son cuestiones que afectan a todas las capas de la sociedad. En este momento adquiere una gran importancia sensibilizar a la población creando una nueva conciencia ética del agua. La vida depende del agua y si se proyecta una mirada hacia el futuro se ve que es un bien escaso cuya calidad y disponibilidad depende de lo que hoy se haga. La denominada crisis del agua se debe a una deficiente distribución y es urgente el desarrollo de nuevas formas de gestión para protegerla, y para que todo el mundo pueda acceder a ella.

2.2. EL AGUA Y LA SALUD

El agua es un elemento de vital importancia para la vida y está íntimamente relacionada con la salud. Las enfermedades infecciosas transmitidas por el agua ocasionan la muerte a unos dos millones de personas al año, en su mayoría niños y están asociadas a la falta de agua potable y de infraestructuras sanitarias (WHO, 2006). En las últimas décadas se han invertido en los países desarrollados sumas importantes en el tratamiento de aguas residuales y se ha conseguido mejorar la calidad de las aguas superficiales. Sin embargo, según datos de la Organización Mundial para la Salud, en el mundo, 1.200 millones de personas carecen de suministro de agua potable y 2000 millones carecen de red de saneamiento, principalmente en América del Sur, Asia y África (UNESCO, 2003; WHO, 2009).

Los microorganismos en el agua fueron observados por primera vez en el siglo XVII por Leeuwenhoek. El agua como hábitat natural no es estéril. Incluso en las aguas no contaminadas viven un gran número y diversidad de microorganismos autóctonos. Estos microorganismos del agua no suponen un riesgo para la salud de las personas saludables, aunque pueden suponer un serio problema para las personas inmuno suprimidas, niños y ancianos, sobre todo si se encuentran en un

número alto. Sin embargo, las bacterias alóctonas procedentes del hombre y los animales, que llegan de manera ocasional al agua, pueden ser causa de numerosas enfermedades infecciosas (Domínguez-Carmona, 2000; Madigan y col., 2004).

La transmisión hídrica de enfermedades, es un hecho bien establecido. Desde hace mucho tiempo se han caracterizado numerosos agentes patógenos. Sin embargo, para una consideración actual del problema no se debe prescindir del hecho de que las circunstancias cambian notablemente. Cambia el poder patógeno de los agentes microbianos de manera que esta evolución puede modificar notablemente las pautas de transmisión. Son muchos los factores que afectan a la evolución del poder patógeno microbiano y no siempre predecible ni controlable (WHO, 2006; Lutsenko y Palahniu, 2010).

Desde la antigüedad se sospechaba que el agua podía transmitir enfermedades. Hipócrates (460-354 A.c.) recomendaba hervirla para evitar algunas enfermedades. Sin embargo, no fue hasta el siglo XIX que se demostró científicamente la importancia del agua como vehículo de infecciones. En el año 1854, durante la epidemia de cólera que asolaba Londres, fue cuando el médico John Snow, demuestra, por estudios epidemiológicos que el origen de la enfermedad era el agua de la fuente de Broad Street, contaminada con aguas residuales del río Támesis. Sin embargo, el agente etiológico causante no se descubrió hasta 1884, en la epidemia de Alejandría, por el microbiólogo Roberto Koch y sus colaboradores, que lo denominaron *Bacillus virgula* por su forma de coma. Actualmente se conocen numerosos tipos de microorganismos patógenos (bacterias, virus, protozoos) que pueden transmitirse por el agua y producir una gran variedad de enfermedades (Domínguez Carmona, 2000).

Los virus constituyen también un grupo importante en la transmisión hídrica de enfermedades (Hirst, 1991). Entre ellos, se encuentran los enterovirus causante de la poliomielitis. Estos tipos de virus son un ejemplo que ilustra muy bien las pautas de cambio en los procesos infectivos que acontecen en el planeta, pues surgieron nuevamente con más fuerza precisamente en sociedades

desarrolladas, como la norteamericana, cuando habían alcanzado mayores cotas de hábitos de vida acordes con las prácticas higiénico sanitarias más avanzadas (Domínguez-Carmona, 2000; WHO, 2006).

Entre las infecciones transmitidas por el agua algunas de las de mayor envergadura son el cólera, producido por *Vibrio cholerae*, la fiebre tifoidea debida a *Salmonella Typhi* y la disentería bacilar por *Shigella dysenteriae*. El cólera cursa con una diarrea acuosa muy abundante que puede producir la muerte por deshidratación (OPS, 1987; Grant, 1998; Rotger, 1997; WHO, 2011; Lutsenko y Palahniu, 2010; Carvajal y Oletta, 2012).

El cólera es un problema controlable pero persistente, que causa infección y mortalidad frecuente. La evolución de la bacteria patógena está constatada claramente y se realizan esfuerzos por obtener una vacuna (Rotger, 1997; WHO, 2011).

Otra de las enfermedades clásicas transmitidas por el agua lo es la fiebre tifoidea, una enfermedad sistémica que produce fiebre alta, cefaleas y afecta a diversos órganos como el hígado y bazo. Esta enfermedad ha sido prácticamente eliminada de los países desarrollados, gracias a un eficaz tratamiento de las aguas, pero todavía son comunes en muchos países de África, Asia y América del Sur. En ocasiones se producen epidemias en Europa y Estados Unidos de fiebres tifoideas cuando se producen fallas en los sistemas de depuración o contaminación con aguas residuales debido a desastres naturales o averías accidentales (Koser y Skinner, 1992; Rotger, 1997; WHO, 2006; Lutsenko y Palahniu, 2010; Carvajal y Oletta, 2012).

Las enfermedades de origen hídrico menos graves y más frecuentes son las gastroenteritis producidas, tanto por bacterias (*Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*, *Aeromonas hydrophila*) como por virus (Rotavirus, Calicivirus, Astrovirus, Coxsackie). Los síntomas más comunes son vómitos, diarreas, fiebre y dolores abdominales (Rotger, 1997; Lutsenko y Palahniu, 2010; Carvajal y Oletta, 2012).

Dentro de las infecciones emergentes de origen hídrico que se han destacado por su alta mortalidad en los últimos años, esta la legionelosis producida por la bacteria *Legionella pneumophila*. Es una enfermedad que aparece por primera vez en 1976 y cursa como una infección respiratoria con fiebre alta, dolores musculares y neumonía. El agente causante lo constituye una especie bacteriana cuya existencia en la naturaleza raramente había afectado a la especie humana. Sin embargo, las instalaciones de torres de refrigeración propias del aire acondicionado determinaron en un momento su propagación en forma de aerosoles a través de las duchas y los climatizadores, conduciendo a infecciones que han resultado, en la mayoría de los casos, fatales en situaciones de riesgo. Ello ha determinado que en los países desarrollados se establezcan medidas específicas de control de esta bacteria (WHO, 2003; WHO, 2006; Lutsenko y Palahniu, 2010).

Los protozoos (*Entamoeba*, *Giardia*, *Cryptosporidium*, *Cyclospora*), son también un ejemplo de los microorganismos transmitidos por el agua. Estos organismos producen disentería y gastroenteritis de larga duración que pueden ser graves en personas inmuno suprimidas. Algunos protozoos de vida libre como *Naegleria* y *Acanthamoeba* pueden causar meningoencefalitis y lesiones en la piel y conjuntiva (WHO, 2011).

El origen más común de los microorganismos antes mencionados que pueden transmitirse por el agua, está en las excretas del hombre o de los animales, principalmente las heces, que contaminan las aguas de bebida con bacterias y virus entéricos, protozoos y huevos de helmintos, y, en menor medida, la orina. Los microorganismos de las heces pueden llegar al suelo donde sobreviven durante un tiempo que depende de las características del suelo y del propio microorganismo, de aquí pasan al agua por el viento y la lluvia (WHO, 2006; WHO, 2011).

La vía de transmisión más frecuente de las bacterias causantes de infecciones hídricas, es la oral a través del agua de bebida. También por el agua de baño se produce una transmisión a través de la piel y de las mucosas, como ocurre en la

leptospirosis, dermatitis y lesiones en la piel producidas por algunas especies de *Mycobacterium* y toxinas de Cianobacterias, otitis y conjuntivitis por *Pseudomonas aeruginosa*, meningitis e infecciones oculares causadas por protozoos (*Naegleria*, *Acanthamoeba*) e infecciones respiratorias por algunos virus como el Adenovirus y el Coxsackie (Rotger, 1997). Además la transmisión puede ser por vía respiratoria, debido a la inhalación de aerosoles, procedentes de diversos aparatos (duchas, torres de refrigeración, jacuzzi), como sucede con la legionelosis, o del riego por aspersión con agua contaminada con Enterovirus. Los humidificadores de agua también pueden contaminarse con actinomicetos, hongos y protozoos produciendo reacciones alérgicas (WHO, 2006; WHO, 2011; Forbes, 2009).

Dentro de las características que hay que tener en cuenta respecto a los microorganismos patógenos transmitidos por el agua, es su resistencia a los agentes químicos, principalmente el cloro que es el desinfectante más utilizado en los tratamientos de depuración de las aguas. En general, las bacterias son poco resistentes al cloro y se destruyen con las dosis habituales utilizadas (1 mg/l), con la excepción de *Legionella* que necesita dosis mayores (5-10 mg/l). Los virus, especialmente Hepatitis A y Norwalk necesitan dosis altas (6 mg/l) y tanto los quistes de protozoos, sobre todo *Cryptosporidium*, como los huevos de helmintos tienen una resistencia al cloro elevada (10-80 mg/l) lo cual permite que sobrevivan a los tratamientos de desinfección utilizados tradicionalmente (WHO, 2006; WHO, 2009).

Uno de los problemas que ha surgido con mucha fuerza en los últimos años, y que tiene una relación directa con las enfermedades de origen hídrico, es la existencia de intercambios genéticos entre las bacterias. Significa esto la posibilidad de diseminación de genes y grupos de genes responsables de la patogenicidad de muchas especies, así como su resistencia a los principales antimicrobianos utilizados para combatir las infecciones. Ello se ve favorecido cuando hay un ambiente que selecciona de manera positiva a aquellas cepas portadoras de dichos determinantes genéticos. Así ocurre con los antibióticos que generan una presión selectiva a favor de las bacterias portadoras de genes de

resistencia a estos agentes, los cuales con frecuencia van asociados a los de patogenicidad. Los avances en los métodos de análisis y selección implican sencillamente una mayor posibilidad de identificar problemas que anteriormente pasaban desapercibidos y que se han de añadir a la problemática sanitaria en relación con el agua, que se vive hoy en día (WHO, 2006; Maier y col., 2009; Lutsenko y Palahniu, 2010; WHO, 2011).

Los datos mencionados anteriormente sobre la salud y el agua dibujan un panorama muy amplio en cuanto a posibilidades, sin embargo la envergadura de los problemas ciertamente varía mucho. En términos generales las enfermedades transmitidas por el agua afectan a unos 2.300 millones de personas cada año en el mundo. La mortalidad que suponen estas infecciones alcanza a 1,96 millones de personas de las cuales el 60% son niños menores de 5 años. Son los resultados o las consecuencias fundamentalmente de esa proporción tan notable de la Humanidad que aun carece de agua potable o de saneamientos adecuados (WHO, 2006; WHO, 2011).

2.3. EL AGUA: PROTECCION Y CONSERVACION

La calidad de las aguas destinadas al consumo humano es una de las principales preocupaciones de los gobiernos que deben proteger la salud de las personas de los efectos adversos derivados de cualquier tipo de contaminación de las aguas. Por ello, la mayoría de los países tienen sistemas de vigilancia y control de las aguas, así como programas de vigilancia epidemiológica que permiten detectar que factores inciden en la falta de calidad del agua (WHO, 1972; WHO-FAO, 1985; OPS, 1987; WHO, 2006).

La primera medida de prevención a ser implementada por los gobiernos es la protección de las zonas de captación: acuíferos, embalses, fuentes y manantiales, evitando o prohibiendo aquellas actividades que puedan contaminarlas. Otra medida necesaria es el tratamiento de las aguas de abastecimiento mediante los diversos sistemas y procesos necesarios para su depuración: almacenamiento,

floculación, coagulación, decantación, filtración y desinfección (Geldreich y col., 1985; WHO, 2003; WHO, 2006; WHO, 2009).

Durante el almacenamiento el agua mejora la calidad debido a que la materia orgánica se destruye por la actividad microbiana, la floculación y los procesos de sedimentación eliminan las pequeñas partículas. Cada uno de los procesos empleados en el tratamiento elimina un alto porcentaje de microorganismos. La eficacia de éstos junto con la desinfección final contribuyen a la destrucción del 99,9% de los microorganismos (WHO, 2006; Gray, 2008).

Para comprobar la eficacia de estos tratamientos los responsables sanitarios controlan las aguas de consumo humano mediante la realización de los análisis establecidos por los organismos internacionales y la legislación vigente en cada país (OPS, 1987; WHO, 2006; WHO, 2011).

El control microbiológico del agua se estableció a principios del siglo XX con la investigación de las bacterias coliformes y *Escherichia coli*. Posteriormente se incluyeron otros indicadores bacterianos fecales como la presencia de *Enterococcus* y esporas de *Clostridium* sulfito reductor. Las mayoría de las normas microbiológicas exigen en todas las aguas de consumo humano ausencia en 100 ml de todos estos indicadores fecales y además en la red de distribución el número de bacterias incubadas a 22 °C no debe superar las 100 por ml (WHO, 1972; Leclerc, 1976; CE, 1980; COVENIN, 1982; Pipes, 1982; OPS, 1987; BOE, 1991; COVENIN, 1993; Gaceta de la Republica Bolivariana de Venezuela, 1998; CE, 1998; Szewzyk y col., 2000; BOE, 2002; WHO, 2006).

Es muy importante realizar un tratamiento y depuración de las aguas residuales para evitar la contaminación de las aguas tanto superficiales como subterráneas, impidiendo la dispersión de los patógenos y la aparición de infecciones hídricas. Además por esta vía, se eliminan otros riesgos sanitarios como la contaminación de alimentos de origen marino, las enfermedades de las aves, infecciones en los bañistas y olores desagradables. La eficacia para eliminar microorganismos y

partículas sólidas varía mucho según los diferentes sistemas y procesos (Lafuente y col., 2000; Weber, 2003; WHO, 2003; WHO, 2009; WHO, 2011).

El agua recogida para el consumo humano se almacena en embalses que se sitúan en las zonas altas de las cabeceras de los ríos. Desde estas zonas alejadas el agua circula por complejos sistemas de distribución que disminuyen la calidad microbiológica del agua. En la mayoría de las ciudades coexisten instalaciones realizadas, a lo largo de muchos años, con distintos materiales, lo que origina frecuentes averías que ponen en peligro la salubridad de las aguas. Como consecuencia de las roturas las aguas se contaminan con tierras, heces de animales salvajes, vertidos de aguas residuales y otros componentes extraños (Lafuente y col., 2000; WHO, 2009).

En muchos países el 30% del suministro doméstico se pierde antes de llegar a su destino por culpa de fugas en las tuberías, equipos defectuosos o sistemas de distribución con un mantenimiento deficiente. Según cálculos recientes, incluso con los sistemas más modernos es normal que se pierda del 10-20 % (WHO, 2006).

La calidad de las aguas superficiales (ríos y lagos) es también un problema importante, ya que a ellas llegan aguas de escorrentía, procedentes de grandes superficies de terreno y la contaminación es inevitable, principalmente la agrícola. Además, en ellas se vierten los efluentes de aguas residuales tratadas y los vertidos domésticos e industriales sin tratar que produzcan contaminación química y microbiológica. La contaminación orgánica produce la eutrofización de las aguas (materia orgánica, fósforo, nitrógeno), favoreciendo el crecimiento de algas y cianobacterias que consumen el oxígeno, por lo que se desarrollan los microorganismos anaerobios. Estos microorganismos producen sustancias que originan olores y sabores anómalos y compuestos tóxicos (UNEPGEMS, 2008; Manahan, 2007).

Estas aguas contaminadas necesitan un tratamiento complejo y caro antes de ser suministradas a los consumidores. La complejidad y el costo del tratamiento se

incrementan al mismo tiempo que la calidad del agua se deteriora (Gray, 2008; WHO, 2009).

Las grandes ciudades precisan plantas potabilizadoras que garanticen el suministro de un volumen elevado de agua de consumo que cumpla los requisitos de salubridad exigidos en la normativa vigente. Para alcanzarlos es necesaria una serie de tratamientos físico-químicos que se llevan a cabo en las distintas etapas de la potabilización. Los principales problemas que surgen en estos tratamientos son fallas en alguna etapa que impiden la eliminación de los microorganismos, formación de compuestos tóxicos y presencia de microorganismos resistentes a la desinfección por el cloro (Gray, 2008).

Una de las primeras etapas del proceso de desinfección del agua es el proceso de decantación. Es una etapa importante para la eliminación de los virus, que son capaces de atravesar los filtros y en su mayoría son resistentes al cloro. En este proceso se añaden al agua dosis de cloro altas (de 2 a 10 mg/l) para la oxidación y posterior eliminación de diferentes compuestos. Si en el agua hay materia orgánica se originan compuestos clorados (tri-halometanos) que no se eliminarán en las sucesivas fases de potabilización. Los tri-halometanos se acumulan en las reservas de grasa del organismo y son cancerígenos. Otro componente químico que se añade como agente floculante es la alúmina. Concentraciones altas de este producto da lugar a un exceso de aluminio en las aguas lo que está relacionado con enfermedades neurodegenerativas (Manahan, 2007; Gray, 2008).

Posterior a la decantación ocurre el proceso de filtración a través de filtros de arena que elimina los quistes de protozoos, muy resistentes a la cloración. Deficiencias en este proceso pueden ocasionar epidemias por parásitos. Los riesgos se incrementan cuando estos filtros no se limpian con regularidad y se originan biopelículas que favorecen el desarrollo de microorganismos, impidiendo su eliminación (OPS, 1987; Weber, 2003, WHO, 2011).

La desinfección de las aguas se realiza generalmente con cloro. Se pueden utilizar otros desinfectantes como el ozono, pero no es tan efectivo por su ausencia de efecto residual y difícil manejo. Sin embargo, las autoridades sanitarias, muestran su preocupación por algunas bacterias patógenas oportunistas que presentan una resistencia al cloro mayor, como *Pseudomonas aeruginosa*, especies de *Mycobacterium* y *Legionella pneumophila* (WHO, 2006; WHO, 2011).

Las redes de distribución también presentan riesgos. Las tuberías y depósitos que contienen agua pueden liberar compuestos tóxicos al agua, como plomo, cobre, hierro, amianto (uralita) formaldehído y ftalatos (Manahan, 2007; Gray, 2008; Bach y col., 2012).

En relación con la vigilancia y control analítico del agua. Lo habitual era establecer un muestreo en determinados puntos de la red de distribución urbana, para vigilar la calidad en las diferentes zonas abastecidas. La frecuencia de los análisis se realizaba en función del número de habitantes del municipio. En la actualidad, las legislaciones vigente ha incluido el muestreo en la red de distribución doméstica y la frecuencia está relacionada con el volumen de agua tratada y el número de habitantes suministrados. La mayor fuente de incidencias y averías sucede en la red domiciliaria y es necesario su control para garantizar la calidad del agua. No basta con la vigilancia del agua a la salida de la planta de tratamiento y en la red urbana, sino que esa calidad debe mantenerse hasta el grifo del consumidor (WHO, 2011).

Al estudiar la población de microorganismos presentes en el agua, no se analizan cada uno de los microorganismos, si no que se buscan grupos de microorganismos que evidencien la posible contaminación de esas aguas, los llamados indicadores de calidad sanitaria. Entre ellos tenemos: Bacterias heterótrofas, coliformes totales y fecales, *Enterococcus*, y mohos y levaduras (Pipes, 1982; Lafuente y col., 2000; WHO, 2006; WHO, 2009; WHO, 2011).

La evaluación de los microorganismos indicadores tiene sus limitaciones. Las técnicas analíticas implicadas en este tipo de análisis deben ser sensibles, reproducibles, rápidas, fiables y fáciles de realizar. Por eso, tradicionalmente se han investigado como indicadores, microorganismos como las bacterias de origen fecal, pero son poco específicas y, aunque han resultado útiles para vigilar el surgimiento de epidemias bacterianas clásicas, no siempre nos alertan de la presencia de algunos microorganismos patógenos, como virus y protozoos. Además en un gran número de brotes hídricos se desconoce el agente causal. Para resolver estos problemas sería necesario proponer técnicas para detectar virus y protozoos. Como indicadores de virus animales se ha propuesto la investigación de bacteriófagos de *Escherichia coli* pero no se han incluido en las más reciente normativa a nivel mundial, debido a una mayor complejidad de la técnica. La detección de parásitos no se incluye en los controles rutinarios pero en las últimas normativas se ha introducido la investigación de *Cryptosporidium* cuando se superen otros parámetros indicadores y si la autoridad sanitaria lo considera oportuno (WHO, 2006; WHO, 2011).

De manera general, se puede señalar que con una buena protección de los acuíferos y de las fuentes de abastecimientos de agua, unidos a un efectivo y constantes tratamiento del agua para el consumo, así como a un monitoreo periódico, los problemas de contaminación del agua deberían reducirse a un mínimo que garanticen su potabilidad y disminuyan el riesgo para la salud del público consumidor.

2.4. LAS AGUAS MINERALES

El agua pura es una especie química definida, integrada por hidrogeno y oxigeno, por consiguiente el agua pura y el agua natural son siempre minerales (Armijo y San Martín, 1994).

La primera definición sobre el agua mineral la da Limón Montero en el año 1697, quien denominó como agua mineral, “aquella que recibe de los minerales alguna virtud extraña” (Limón Montero, 1697).

Armijo en el año 1968, las define como las aguas que procediendo de un manantial o fuente pueden ser utilizadas directamente con fines terapéuticos por haber sido aceptadas por los organismos competentes, siendo por lo tanto verdaderos medicamentos (Armijo, 1968).

Posteriormente, en el año 1969, la Organización Mundial de la Salud (WHO), considera como agua mineral natural, las bacteriológicamente incontaminadas, procedentes de fuentes subterráneas, con un mínimo de un gramo de minerales por kilogramo o 250 miligramos de anhídrido carbónico libre, con propiedades favorables para la salud, según criterios admitidos por el comité FAO-WHO (Armijo y San Martín, 1994).

De manera general podemos señalar que el agua mineral tiene su origen en estratos o yacimientos subterráneos y brotan de un manantial en uno o varios puntos de alumbramiento, naturales o perforados. Se diferencia de las restantes aguas, por su naturaleza, caracterizada por su contenido de minerales, oligoelementos y, en ocasiones, por determinados efectos y por su pureza original (Armijo y San Martín, 1994).

2.4.1. Origen de las aguas minerales

Hasta finales del siglo XIX a las aguas minerales se les suponía un origen volcánico y casi milagroso. Los estudios posteriores han puesto de manifiesto que casi todas las aguas minerales proceden de aguas meteóricas, lluvia o nieve, infiltradas desde la superficie del terreno y, en menor proporción, de la infiltración de aguas fluviales o lacustre (Chapelle, 2001; Tampo, 2004). Sin embargo, las aguas minerales se siguen dividiendo tradicionalmente, por su origen en tres grandes grupos:

a. **Superficiales o de infiltración:** Brotan de fallas sin relación con filones metálicos o rocas eruptivas. El caudal que varía con la lluvia y las estaciones, está en relación inversa con la mineralización. No contiene elementos característicos de las emanaciones metálicas de las profundidades (boro, arsénico, bromo, flúor,

cobre). La temperatura varía y suele ser inferior a 30° C.

b. Profundas, magmáticas o primitivas: Brotan de fallas relacionadas con filones metálicos o eruptivos. El caudal es rítmico pero constante. La composición química es constante encontrándose en estado libre elementos propios de emanaciones metálicas. Frecuentemente son radiactivas. La temperatura es constante y suele ser elevada.

c. De origen mixto: cuando se mezclan aguas meteóricas de infiltración reciente con aguas profundas.

Las aguas minerales aprovechan una falla del terreno y se filtran hasta profundidades de dos a cuatro kilómetros. Gracias a las corrientes ascendentes del centro de la tierra, alcanzan grandes temperaturas, pierden oxígeno y se remineralizan porque se ponen en contacto con las rocas de la zona por donde pasan y adquieren su mineralización. Suelen acumularse en un reservorio durante años y permanecen en la profundidad de la tierra. Posteriormente, debido a las presiones de esa zona buscan un canal de ascenso y salen a la superficie de la tierra. (Chapelle, 2001; Tampo 2004).

2.4.2. Clasificación de las aguas minerales

No existe todavía una clasificación definitiva de las aguas minerales y a pesar de los múltiples intentos no se ha llegado a una que pueda admitirse sin discusión, siendo frecuente las que se basan en varios aspectos: geológicos, hidrológicos, químicos y terapéuticos.

Las clasificaciones tradicionalmente propuestas son las siguientes:

a. Geológica

Se basan en las características del suelo en el que surgen los manantiales buscando el origen de la mineralización de las aguas. Actualmente tienen muy

poco valor práctico y están en desuso (Arias y col., 1995).

b. Temperatura

En 1829, Ossen clasificó por primera vez las aguas por su temperatura de emergencia en: Frías (hasta 18 °C), frescas (18-24 °C), tibias (24-31 °C), calientes (31-37 °C) y muy calientes (37-100 °C).

Wollmann, en 1943, clasificó las "aguas con calor natural" en 3 grupos: Tibias: 20-29° C, calientes: 30-39° C y muy calientes: 40° C o más (Masoud y col., 1982; Arias y col., 1995).

De acuerdo a Armijo, (1968), quien utiliza una clasificación que tiene en cuenta la temperatura del cuerpo humano, establece las siguientes clases:

- Frías: <20° C
- Hipo termales: 20-30° C
- Meso termales: 30-40° C
- Hipertermas: > 40° C

c. Presión Osmótica

Otras clasificaciones se basan en la presión osmótica (Armijo y San Martín, 1994), estableciéndose los siguientes grupos:

- Hipotónicas: inferior a 6,5 atm
- Isotónicas: igual a 6,5 atm
- Hipertónicas: superior a 6,5 atm

d. Mineralización.

De acuerdo a la mineralización determinada por el residuo seco obtenido a 110° C (Armijo y San Martín, 1994), se han dividido las aguas en:

- Oligometálicas: Hasta 100 mg/l
- Mineralización muy débil: Desde 100 hasta 250 mg/l
- Mineralización débil: Desde 250 hasta 500 mg/l
- Mineralización media: Desde 500 hasta 1500 mg/l
- Mineralización fuerte: Más de 1500 mg/l sin alcanzar la concentración del agua marina
- Mineralización marina: Semejantes o superior al agua marina.

e. Composición química.

Esta clasificación es una de las más difundidas y se basan en el contenido de elementos aniónico y catiónico predominante (Armijo y San Martín, 1994)

- Aciduladas: (más de 250 mg de CO₂)
- Alcalinas: (con predominio de sodio y bicarbonato)
- Amargas: (con predominio de sulfatos, sodio y magnesio)
- Arsenicales: (más de 0,2 mg As)
- Estróncicas: (más de 10 mg Sr)
- Ferruginosas: (más de 5 mg Fe)
- Litínicas: (más de 1 mg Li)
- Boratadas: (más de 4 mg de ácido metabórico)
- Bromuradas: (más de 4 mg Br)
- Fluoradas: (más de 2mg F)
- Yoduradas: (más de de 1 mg I)
- Sulfurosas: (con sulfuro, sulfhídrico o tiosulfato)
- Radiactivas: (más de 5 u Maché)

En España se ha establecido la siguiente clasificación para las aguas minerales (BOE, 2002):

- Bicarbonatada: Más de 600 mg/l de bicarbonato
- Sulfatada: Más de 200 mg/l de sulfato

- Clorurada: Más de 200 mg/l de cloruro
- Cálctica: Más de 150 mg/l de calcio
- Magnésica: Más de 50 mg/l de magnesio
- Fluorada: Más de 1 mg/l de fluoruros
- Ferruginosa: Más de 1 mg/l de hierro bivalente
- Acidulada: Más de 250 mg/l de CO₂ libre
- Sódica: Más de 200 mg/l de sodio

2.4.3. Características físico-químicas

Las aguas minerales subterráneas que circulan por la corteza terrestre constituyen agentes fundamentales en los procesos geológicos de formación de la estructura de la tierra. Siendo un solvente natural complejo y dinámico, el agua participa tanto en los procesos de disolución y transporte como en las reacciones químicas y en la transferencia de calor, gases y elementos químicos (Rodier, 1998; Chapelle, 2001; Tampa 2004).

Las propiedades físico-químicas de las aguas, mineralización y temperatura dependen de la composición del agua que se infiltra, de los procesos biogeoquímicos que tienen lugar en la denominada zona no saturada que existe entre la superficie del terreno y la capa freática, y de la trayectoria y tiempo que sigan las partículas de agua subterránea. El tipo de minerales con los que entra en contacto el agua en su camino, así como la temperatura de las rocas que atraviesa juegan un papel primordial en las modificaciones que experimenta la composición química original de ese agua (Masoud y col., 1982; Llamas, 1992; Chapelle, 2001; Tampa, 2004).

En el año 1911, el investigador Grunhut señala que para que se considere un agua como mineral, esta debe contener más de un gramo de sustancia sólida disuelta por kilogramo de agua o bien componentes especiales en cantidades superiores a determinadas proporciones o una temperatura superior a 20° C (Armijo y San Martín, 1994).

Las aguas minerales pueden definirse, desde un punto de vista fisicoquímico, como una fase heterogénea formada por una suspensión de sustancias orgánicas e inorgánicas, normalmente diluida, cuyo solvente es la molécula de agua. Esta sustancia es por lo tanto el componente mayoritario de las aguas minerales, y sus propiedades, principalmente las físicas prevalecen sobre las de los demás componentes, difiriendo muy poco de las propiedades físicas del agua pura, sin embargo, las propiedades químicas se modifican considerablemente por la incorporación de elementos mineralizantes (Armijo y San Martín, 1994).

Entre los principales elementos químicos presentes en el agua mineral tenemos:

- **Sodio:** Es uno de los elementos más distribuidos en la naturaleza, se encuentra en todas las aguas minerales y en muchos casos como catión predominante (Armijo y San Martín, 1994).
- **Potasio:** Se encuentra muy distribuido en la corteza terrestre, de donde por procesos de disolución pasa al agua mineral. El contenido de potasio de las aguas minerales oscila entre 1/5 a 1/20 del de sodio. Con frecuencia las aguas minerales ricas en potasio son de origen profundo (Armijo y San Martín, 1994).
- **Litio:** Existe muy distribuido en la naturaleza, aunque en pequeñas cantidades en diversos tipos de rocas y arcillas, a partir de las cuales por disolución llega a las aguas minerales (Armijo y San Martín, 1994).
- **Magnesio:** Aproximadamente el 2,2 por ciento de la corteza terrestre lo forma el magnesio, que a causa de su gran reactividad química no se presenta libre, sino combinado, formando minerales y rocas. Llega al agua mineral luego de sufrir distintos y variados procesos de disolución. El magnesio como el calcio es un componente habitual de las aguas minerales, en particular de las procedentes de terrenos terciarios (Armijo y San Martín, 1994).
- **Calcio:** El calcio se encuentra muy extendido en la naturaleza, constituyendo aproximadamente el 3,5 por ciento de la corteza terrestre. Forma parte de un

gran número de rocas y minerales y de muchas aguas minerales, normalmente frías, a consecuencia de la acción de los agentes atmosféricos sobre las rocas (Armijo y San Martín, 1994).

- Hierro: El hierro es uno de los metales más abundantes de la corteza terrestre y constituye el 4,7 por ciento de ella. Se presenta con mucha frecuencia en minerales oxigenados y sulfurados. Las aguas minerales que contienen más de 10 mg/L de hierro, se denominan ferruginosas (Armijo y San Martín, 1994).
- Oligoelementos: Corresponde a un grupo de sustancias cuya presencia se ha detectado en el agua mineral en muy baja cantidad. Entre ellas podemos mencionar: Manganeso, aluminio, plata, plomo, bismuto, cinc, cadmio, galio, titanio y vanadio (Armijo y San Martín, 1994).

Además de los elementos y oligoelementos, en el agua mineral podemos encontrar diversos tipos de iones como:

- Cloruros: Se considera un agua mineral clorurada cuando el contenido en este anión supera al 20 % del total de aniones expresados en mili equivalentes. Las aguas cloruradas pueden tener un origen terrestre o marino. Las terrestres suelen adquirir su contenido de minerales por contacto con depósitos lagunares ubicados en terrenos del triásico superior (Armijo y San Martín, 1994).
- Bicarbonatos: Se consideran aguas bicarbonatadas las que con un residuo seco superior a 1 g/L, tienen como componente aniónico predominante el bicarbonato. Este es el anión que con mayor frecuencia se encuentra en las aguas minerales y suele acompañarse de los cationes sodio, calcio y magnesio- Se admite que el bicarbonato de las aguas minerales procede de la reacción entre el cloruro sódico y el sílice que se produce en el seno de la tierra en presencia del agua, formándose inicialmente silicato sódico que a su vez será origen del bicarbonato sódico (Armijo y San Martín, 1994),

- **Sulfuros:** Las aguas sulfuradas se caracterizan por contener más de un miligramo de azufre titulable por litro, de azufre bivalente, con frecuencia en forma de SH_2 o SH^- , si bien pueden estar presentes otros compuestos azufrados como los poli sulfuros y los tiosulfato (Armijo y San Martín, 1994).
- **Sulfatos:** En la composición de las aguas minerales figuran con frecuencia los sulfatos. Su presencia es frecuente y muchas veces abundante, toda vez que los sulfatos están ampliamente distribuidos en la naturaleza y el agua los puede incorporar al contactar con rocas y minerales que contienen sulfatos o bien por oxidación de los sulfuros y otros compuestos reducidos del azufre. Se consideran aguas sulfatadas las que con una mineralización mínima de un gramo por litro, tiene como anión predominante el sulfato, compuesto oxidado de azufre hexavalente (Armijo y San Martín, 1994).

Por último, las aguas minerales también pueden contener disueltos o suspendidos una serie de gases como el hidrogeno, el oxigeno, el nitrógeno, dióxido de carbono, sulfuro de hidrogeno y radón entre otros (Armijo y San Martín, 1994).

Otro factor importante de las características físico-químicas de las aguas minerales lo constituye, su contenido radiactivo al que se le ha dado mucha importancia. Las aguas con elementos radiactivos disueltos pueden producir, como consecuencia directa de su consumo, dosis de irradiación interna tanto por ingestión como por inhalación de estos elementos. El contenido de la radiactividad en el agua nos lo proporcionan los índices de radiactividad alfa total y beta total, cuya medida es simple y rápida. Los isótopos radiactivos que habitualmente se encuentran presentes en el agua, proceden de las series radiactivas naturales de los radionúclidos primarios U-238, U-235 y Th-232, que se encuentran distribuidos abundantemente, aunque de forma desigual, en la corteza terrestre. En las aguas subterráneas el mayor porcentaje de radiactividad se debe al Radón 222, un gas noble de escasa reactividad química (Palomares y Pozuelo, 2004).

2.4.4. Características microbiológicas

Las aguas envasadas poseen una población microbiana variable y no numerosa que depende de sus condiciones fisicoquímicas, ambientales, climáticas y ecológicas. En la microbiota de las aguas minerales influyen, de manera importante, sus características físico-químicas, principalmente la temperatura y la composición en sales por lo que cada agua mineral tendrá una población microbiana típica, distinta y característica del manantial de donde procede (Balkwill y Boone, 1997; Stelz, 1997; De la Rosa y Mosso, 2000; Chapelle, 2001; Armijo, 2001; Leclerc y Da Costa, 2004, Senior y Dege, 2005).

Las cifras obtenidas en el recuento de microorganismos totales, utilizando métodos de microscopia de epifluorescencia, en manantiales de aguas minerales de diversas partes del mundo, ha fluctuado entre 10^4 y 10^7 células por mililitro de agua (Oger y col., 1987; Meir y Burkner, 1997; Coelho y col., 1998; Defives y col. 1999; Urmeneta y col., 2000; Mosso y col., 2002; De la Rosa y col., 2004; De la Rosa y col., 2007; De la Rosa y col., 2009; Oyedeji y col., 2010; Mosso y De la Rosa, 2011).

La presencia de microorganismos en las aguas minerales provenientes de acuíferos se ha atribuido a los flujos hidrológicos del agua que han llevado desde la superficie microorganismos y los mismos han producido una colonización horizontal y vertical de la tierra (Ghiorse y Wilson, 1988; Madsen y Ghiorse, 1993; Chapelle, 2001; Leclerc y Da Costa, 2004). Según Schmidt- Lorenz (1976) esta microbiota se multiplica en el agua del manantial y se renueva continuamente. El crecimiento de las poblaciones bacterianas naturales en este sistema de flujo abierto heterogéneo, puede tener lugar, dependiendo de las condiciones locales, en parte como un cultivo estático y en parte como un cultivo continuo. Es posible que la reproducción bacteriana se produzca al menos temporalmente y que, una multiplicación significativa de la microbiota autóctona tenga lugar en las zonas subterráneas de los manantiales (Roszad y Colwell, 1987; Bischofberger y col., 1990; Leclerc y Moreau, 2002).

Las bacterias pueden estar libres en el agua y/o adheridas a partículas y superficies sólidas. Las bacterias consiguen sus nutrientes, casi exclusivamente, de las sustancias orgánicas de bajo peso molecular disueltas en el agua. Las sustancias de peso molecular alto se adsorben a las superficies y pueden ser utilizadas por las bacterias adheridas por medio de enzimas unidos a la pared celular. Por esta razón, en aguas naturales, con pocos nutrientes suele ser mayor el número de bacterias adheridas que las libres en suspensión (Wardell y col., 1983; Geldreich y col., 1985; Ghiorse y Wilson, 1988; Chapelle, 2001; Leclerc y Moreau, 2002).

La mayoría de las bacterias autóctonas son quimioorganotróficas y oligotróficas. Es decir, necesitan muy poca cantidad de materia orgánica por lo que pueden crecer a concentraciones de 1-15 mg de carbono orgánico por litro (Schmidt-Lorenz y col., 1990; Leclerc y Da Costa, 2004). Los requerimientos de nitrógeno también son mínimos, menos de 1 g/l, por lo que son oligonitrofilicas. Algunas pueden ser quimiolitótrofas opcionales y utilizar hidrógeno o CO₂ como fuente de energía. Estas bacterias suelen ser prototróficas porque no necesitan factores de crecimiento (Koch, 2001; Nagarkar, 2001). Son aerobias o anaerobias facultativas, aunque de acuerdo con su bajo metabolismo solo necesitan pequeñas cantidades de oxígeno, algunas especies pueden crecer con menos de 0,5 % y otras son capaces de realizar la respiración anaerobia en presencia de nitratos o nitrito (Leclerc y Da Costa, 2004).

La identificación de las bacterias acuáticas y en particular la de las aguas minerales, es difícil y depende de los métodos de laboratorio, en muchos casos poco eficaces para clasificar estas especies (Stetzenbach y col., 1986; Manaia y col., 1990; Leclerc y Moreau, 2002). Además, los estudios realizados han sido de bacterias heterótrofas por lo que el conocimiento que se tiene de las especies constituyentes de la microbiota autóctona es muy incompleto. La mayoría de los autores (Ducluzeau y col., 1976; Nicoletti y Russo., 1979; Schwaller y Schmidt-Lorenz 1980; Schwaller y Schmidt-Lorenz, 1981; González y col., 1987; Stickler, 1989; De la Rosa y Mosso, 2000; Mary y col., 2000; Leclerc y Moreau , 2002; Mosso y De la Rosa, 2011) están de acuerdo en que las bacterias Gram

negativas son las predominantes, entre un 60 a un 90 %, aunque también existen bacterias Gram positivas, entre un 6 a un 20 % (Quevedo-Sarmiento y col., 1986; Bischoberger y col., 1990; Mavridou, 1992; Mosso y col., 1994; De la Rosa y Mosso, 2000).

2.5. LAS AGUAS MINERALES ENVASADAS

2.5.1. Historia

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 medicamentosas para restituir la salud de las personas (Tampo, 2004).

Ya en el año 400 A.c. 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).

Posteriormente, durante el imperio Romano, muchas de las famosas fuentes de aguas minerales de Europa, comenzaron a ser referencias como centros para restituir la salud. La hidroterapia introducida en Roma por Asclepio fue difundida por los estudios y la práctica de Celso, Plinio y Galeno. Esta se basaba en las propiedades físicas del agua, especialmente la temperatura e incluía su administración por vía oral. También Séneca (4ac-65dc) en la obra "Naturales cuestiones" incluye referencias favorables al efecto curador de las aguas minerales. Las aguas se clasificaban de acuerdo con los minerales que contenían. Pero fue Plinio (23-79) uno de los mayores entusiastas de las aguas minerales; en su "Historia Natural" describe distintos tipos de aguas minerales y sus indicaciones terapéuticas (Jackson, 1990; Lamoreaux y col., 2001).

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 al agua 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 físico-químicas 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).

De igual forma, diversas culturas en el mundo fomentaron el uso de las aguas minerales. El Islam consideraba la hidroterapia como algo prestigioso. Rhazes y Avicena, considerados los mayores médicos de lengua árabe, desarrollaron la hidroterapia como técnica de aplicación en forma de baños, bebidas y aplicaciones locales en quemaduras, viruela y hemorragias. Los médicos árabes Albucasis, Avenzoar y Avicena los recomendaban para la artritis, obstrucciones y otras varias enfermedades (Sánchez Granjel, 1981).

En América del Norte, América Central y América del Sur 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 del 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 Nueva York fueron envasadas para uso comercial. De igual forma, en el año 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 en diversos países europeos (Chapelle, 2005).

En un principio el agua era envasada en recipientes de vidrio y las botellas de plástico no fueron utilizadas hasta mediados del siglo XX (Chapelle, 2005).

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; Royte, 2009; Dege, 2011).

2.5.2 Clasificación de las aguas minerales envasadas

De manera de poder establecer criterios que clarifiquen que se entiende por aguas minerales envasadas, cada país ha establecido una reglamentación y normas donde se definen los distintos tipos de aguas minerales envasadas.

La reglamentación ha tenido como objetivo definir, para los efectos legales, lo que se debe entender por agua de bebida envasada y establecer las normas de manipulación, elaboración, circulación, comercialización y, en general, la ordenación jurídica de estos productos.

De esta manera, el agua mineral envasada ha sido definida por la Food Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos de Norteamérica como agua que se vende en botellas o en otro tipo de contenedor y es utilizada para consumo humano (Rosenberg, 1990).

Este Organismo las clasifica en:

1. Agua de manantial: Tomada directamente de un pozo y envasada con un mínimo de tratamiento.
2. Agua potable preparada: Cuando el contenido mineral ha sido ajustado y controlado.
3. Agua purificada: Es aquella en donde se remueven los minerales a un contenido menor de 10 mg/l. Puede ser purificada por destilación, intercambio iónico u ósmosis reversa.

4. Agua Fluoridada: Agua a la que se le ha añadido flúor.

En España, de acuerdo a Amijo y San Martín (1994), las aguas minerales envasadas se clasifican en:

1. Aguas minerales naturales gaseosas: Agua con anhídrido carbónico natural.
2. Agua mineral natural reforzada con gas del mismo manantial: Corresponden a aquellas cuyo contenido en anhídrido carbónico, una vez envasada, sea superior al que tuviese en el o en los puntos de alumbramiento. El gas añadido debe proceder del mismo manantial.
3. Agua mineral natural con gas carbónico añadido: Corresponden a aquellas a las que se les ha añadido anhídrido carbónico no proveniente del mismo manantial.
4. Agua mineral natural totalmente desgasificada: Corresponde a aquellas a las que se les ha eliminado el gas carbónico libre por procedimientos físicos.
5. Agua mineral parcialmente desgasificada: Son aquellas a las que se les ha eliminado parcialmente el gas carbónico libre
6. Agua de manantial: Son las aguas minerales de origen subterráneo que emergen espontáneamente en la superficie de la tierra o se captan mediante labores practicadas al efecto, con las características naturales de pureza que permiten su consumo, previa aplicación de unos mínimos tratamientos físicos.
7. Aguas minerales preparadas: Son aguas que proceden de manantiales, sometidas a tratamientos fisicoquímicos para que reúnan las características bacteriológicas y químicas establecidas en la normativa.
8. Aguas de consumo público envasadas: Son aquellas aguas de consumo público, envasadas coyunturalmente para distribución domiciliaria.

De acuerdo a la Normativa venezolana se define como "**Agua envasada para consumo humano**", aquella captada directamente de fuentes de orígenes subterráneas (Aljibes, pozos o manantiales), cercano al sitio de envasado, y que cumple con los requisitos establecidos por las normativas vigentes, procesada y contenida en recipientes apropiados, aprobados por las autoridades sanitarias competentes y con cierre hermético inviolable, el cual debe permanecer en tal

condición hasta que llegue a manos del consumidor final. El agua de la fuente utilizada para envasar agua denominada “Mineral natural” puede ser sometida a tratamientos físicos como aireación, sedimentación natural, luz ultravioleta y filtración, autorizados por el Ministerio de Sanidad y Asistencia Social (COVENIN, 1982; COVENIN, 1993).

2.5.3. Características microbiológicas

Según Schmidt-Lorenz (1976), la microbiota de un agua mineral envasada está constituida por dos tipos de microorganismos: Los llamados autóctonos que son los propios del hábitat y que constituyen la microbiota natural y los alóctonos procedentes de otro hábitat y que se consideran contaminantes ocasionales.

De acuerdo a su capacidad de supervivencia, la microbiota contaminante puede dividirse en transitoria y permanente (Schmidt-Lorenz, 1976). La transitoria consiste, principalmente, en bacterias que no se multiplican en agua mineral y mueren o se convierten en no cultivables al cabo del tiempo, como *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella aerogenes* y *Enterococcus faecalis* (Ducluzeau y col., 1976b; Leclerc y Da Costa, 2004). La permanente consiste en especies oligocarbotolerantes que pueden multiplicarse en sustratos con escasos nutrientes y permanecer viables durante mucho tiempo. Suelen ser bacterias Gram negativas, psicrófilas y mesófilas como *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* (Ducluzeau y col., 1976a; González y col., 1987; Leclerc, 1994; Leclerc y Moreau, 2002).

En aguas minerales envasadas, las bacterias más frecuentes encontradas por varios autores pertenecen a los géneros *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Brevundimonas*, *Burkholderia*, *Chryseomonas*, *Comamonas*, *Ochrobactrum*, *Sphingomonas*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Cytophaga*, *Xanthomonas* y *Flexibacter*. (Schwaller y Schmidt-Lorenz, 1980; Slade y col., 1986; Manaia y col., 1990; Warburton y col., 1994; Jasekara y col., 1998; Zanetti y col., 2000; Tiago y col., 2004; Loy y col., 2005). En menor proporción se han detectado bacilos Gram positivos irregulares como *Arthrobacter*

y *Corynebacterium* (Niemi y col., 1982; Varnan y Sutherland, 1994; Leclerc y Moreau, 2002).

De igual forma se ha indicado el aislamiento de hongos, los cuales por lo general, suelen estar en número muy pequeño, predominando los mohos sobre las levaduras. Se han aislado los géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria* y *Rhodotorula* en algunos manantiales y aguas minerales envasadas (Niemi y col., 1982; Fujikawa y col., 1997; Fujikawa y col., 1999; Cabral y Fernández, 2002; Criado y col., 2005; Yamaguchi y col., 2007).

Por otra parte, algunas de las especies de *Pseudomonas*, *Brevundimonas*, *Burkholderia*, *Chryseomonas*, *Comamonas*, *Ochrobactrum*, *Stenotrophomonas* y *Aeromonas*, aisladas en este tipo de ecosistema acuáticos se han considerado como patógenos oportunistas en niños, ancianos y personas inmunosuprimidas (Havelaar y col., 1990; Campa y col., 1993; Stampi y col., 1999; Mary y col., 2000; Massa y col., 2001; Biscardi y col., 2002; Theron y Cloete, 2002; Arda y col., 2003; Hill, 2003; Chi y col., 2004; Chihab y col., 2004; Charity y Foukas, 2005; Cooper, 2005; Leoni y col., 2005; Oie y col., 2009).

De igual forma, diversos autores han demostrado la resistencia a los antibióticos de cepas de bacterias autóctonas de aguas minerales (Rosenberg y Hernández-Duquino, 1989; Kailis y col., 1991; Massa y col., 1995; Vachee y col., 1997; Wilkinson y Kerr, 1998; Mary y col., 2000; Messí y col., 2005; Ullah y col., 2012; Vaz-Moreira, 2012) lo que puede ser de gran interés desde el punto de vista de la salud pública.

La mayoría de los microorganismos señalados como patógenos oportunistas y que se han encontrado en las aguas minerales envasadas se transmiten por vía oral. Sin embargo, las aguas minerales se utilizan también en Balnearios en forma de baños, duchas y aerosoles y por tanto, es importante tener en cuenta otras vías de transmisión y otros microorganismos que también pueden estar presentes tales como mohos, levaduras y parásitos (Armijo y San Martín, 1994).

La microbiota presente en el agua mineral envasada incrementa su número luego del envasado, llegando a su máximo nivel al final de la primera semana (González y col., 1987; Hammes y col., 2010). Después de transcurrido este tiempo, el contenido bacteriano permanece más o menos constante por espacio de 6 meses. Es importante señalar que la microbiota del agua mineral no carbonatada es mayor que la del agua mineral carbonatada (con gas), dado a la acción antimicrobiana del anhídrido carbónico presente en las mismas (Koser y Skinner, 1992).

La población microbiana puede unirse a la superficie interna de las botellas debido a hidrofobicidad de los microorganismos, tal y como lo sugiere Jasekara y col. (1999), liberando material orgánico de la propia botella que ayudaría al crecimiento microbiano (Evandri y col., 2000). Este hecho explicaría en parte el aumento del crecimiento observado luego del envasado del agua, además se ha señalado que las botellas de agua mineral pueden ser un ambiente oligotrófico con poca cantidad de nutrientes pero suficiente para mantener el crecimiento de la microbiota autóctona presente en el agua (Criado y col., 2005; Jeena y col., 2006; Hammes y col., 2010).

Las autoridades legislativas europeas reconocen la existencia de microorganismos en estas aguas pero en un número bajo. Así, tanto la Directiva Europea (CE, 1998), como la normativa española (BOE, 2002) que regulan los usos de las aguas minerales envasadas establecen que en los puntos de alumbramiento del manantial, el contenido total de microorganismos aerobios viables de un agua mineral natural deberá ajustarse a su microbiota normal y no será mayor de 20 ufc/ml a 22 °C y 5 ufc/ml a 37 °C. Efectivamente, el agua mineral tomada directamente de los manantiales tiene pocas bacterias, menos de 100 unidades formadoras de colonias por mililitro, que se multiplican y persisten indefinidamente en el agua (Fox, 1988; Leclerc y Moreau, 2002).

Las condiciones microbiológicas del agua mineral envasada son diferentes de un lugar a otro, y de un país a otro, lo que refleja no solo la calidad de las fuentes de

agua y sus características fisicoquímicas y geológicas, sino también el control del proceso que se lleva en las plantas envasadoras.

2.5.4. Proceso de envasado

Puesto que son muy pocos los tratamientos permitidos durante el proceso de envasado del agua mineral, la tecnología que se requiere es relativamente sencilla.

Tanto la normativa internacional como la normativa venezolana señalan la prohibición de cualquier tratamiento que lleve consigo la alteración de las propiedades organolépticas originales del agua mineral. Del mismo modo, establecen que no se puede emplear ningún proceso que persiga la esterilización o desinfección del agua envasada (CE, 1980; COVENIN, 1982; BOE, 1991; COVENIN, 1993; CA-WHO-FAO, 1997; CE, 1998; BOE, 2002).

Algunas plantas de envasado están alimentadas de un manantial natural o pozo artesanal, en el que el agua brota por su propia presión. En otros casos, es preciso hacer uso de bombas para extraer el agua del subsuelo. En este último caso, es esencial mantener un protocolo de limpieza y desinfección de los equipos de bombeo para prevenir todo tipo de contaminación durante la captación (Tampo, 2004).

Un aspecto que se debe vigilar y regular es el relacionado con la selección y cuidado del acuífero utilizado como fuente de agua mineral. El acuífero ideal es aquel que es profundo, con un tiempo de residencia adecuado y que presenta pocas aberturas y fisuras. Este último aspecto es muy importante ya que a mayor número de fisuras, mayor es la probabilidad de contaminación con agentes del medio ambiente o desechos agrícolas e industriales. Es importante monitorear frecuentemente el agua del acuífero para detectar posibles contaminantes, tanto químicos como biológicos (Rodier, 1989; Tampo 2004; Senior y Dege, 2005).

La conducción del agua desde el punto de donde emerge hasta la planta de envasado se ha de hacer a través de un material apto para el contacto con

alimentos, como el acero inoxidable o materiales plásticos. En cualquier caso, la conducción debe ser inspeccionable, cerrada, continúa y estar totalmente protegida frente a la eventual contaminación. No son recomendables los almacenamientos de grandes masas de agua en recintos previos a la planta, pues esta práctica conlleva una proliferación de la microbiota presente (Varnan y Sutherland, 1994; Tampo, 2004; Senior y Dege, 2005).

Para las aguas minerales se permite la oxigenación, decantación y/o filtración para la separación de elementos inestables, tales como el hierro, azufre y otros, siempre que dicho tratamiento no persiga modificar la composición de aquellos constituyentes del agua que le confieren sus propiedades esenciales. Se permite también, en este tipo de aguas, la adición o eliminación de anhídrido carbónico, así como la separación de compuestos de hierro, manganeso y arsénico por aire enriquecido en ozono (CE, 1980; COVENIN, 1982; COVENIN, 1993; CE, 1998; BOE, 2002).

En todo caso, los pre tratamientos y tratamientos que se le pueden aplicar al agua mineral antes del envasado deben realizarse en recipientes y equipos de acero inoxidable, con una limpieza y desinfección adecuada (Varnan y Sutherland, 1994).

Los procesos durante el envasado del agua mineral son: almacenamiento de envases, transporte de envases, llenado-taponado, etiquetado, codificación, almacenaje de producto terminado, control de calidad y distribución. (Tampo, 2004; Senior y Dege, 2005; Dege, 2011).

Los envases utilizados actualmente para el embotellamiento del agua mineral son el polietilentereftalato (PET), el polivinilo cloruro (PVC), el vidrio y el polietileno de alta densidad. En la actualidad la mayoría de las empresas envasadoras de agua mineral utilizan envases de PET. El proceso de fabricación de la botella de PET es sencillo, no obstante la máquina encargada de esta labor es costosa y no todas las compañías la poseen (Dege, 2011).

Ya sea de forma directa o indirecta, los envases de PET llegan a los grupos de llenado, manualmente o mediante distintos tipos de cintas transportadoras de botellas existentes en el mercado. La máquina llenadora puede ser del tipo rotatorio con válvulas de llenado mecánicas que se abren ante la acción directa del envase. También hay llenadoras de tipo lineal. Las llenadoras de última generación poseen válvulas de llenado electro neumáticas que no entran en contacto físico con el envase, vertiendo el producto ante la presencia del envase en su lugar correspondiente, lo que es detectado por una fotocélula que da la orden de llenado a una válvula en particular (Senior y Dage, 2005).

La etapa siguiente del proceso de envasado es el cierre del envase, el cual se lleva a cabo en unas máquinas que dispensan la tapa a medida que pasa el envase (Tampo 2004).

Un punto importante a controlar es la limpieza y asepsia del ambiente de la sala de envasado, que, por supuesto, debe estar aislada del resto de las dependencias de la planta. Esto debe ser así porque hasta que el envase no se ha cerrado, este estará expuesto a la contaminación ambiental (Dege, 2011).

El siguiente proceso es el etiquetado, en cualquiera de sus dos modalidades: etiqueta autoadhesiva o etiqueta adherida al envase por pega caliente o fría. Después, el envase se dirige a una impresora láser o de inyección de tinta, la cual imprime el lote y la fecha de consumo preferente. Finalmente, los envases pasan a la fase de almacenamiento o distribución en cajas o paquetes (Tampo, 2004).

Finalizada la etapa de etiquetado, generalmente se introduce un control visual, de manera de realizar un control de calidad a los procesos de envasado, retirando los envases defectuosos detectados.

Los puntos principales a controlar en un sistema de control de calidad en una industria de envasado de agua mineral son: adecuación y protección del sitio de la captación del agua mineral, contra la contaminación, protección del sistema de conducción hasta la planta, prevención de proliferación microbiana en las

instalaciones de envasado y control de calidad de producto final (Geldrich y col., 1985; Jayasekara y col., 1999; Venieri y col., 2006; Dege, 2011).

Se aconseja que la captación esté próxima a la planta de envasado para evitar largas conducciones de agua. Por otra parte, y lo que es más importante, debe existir un protocolo eficaz de limpieza y desinfección de las líneas de conducción de agua desde el punto de captación hasta las válvulas de llenado. Estos protocolos deben ser diseñados de acuerdo con la instalación existente en la planta, analizando los “pros y contras” de cada tipo de higienización. La limpieza de las instalaciones debe realizarse con productos ácidos o cáusticos. La desinfección puede ser química (con productos oxidantes) o bien física (con agua caliente o vapor de agua). En cualquier caso, es de vital importancia que el diseño de las instalaciones se realice de tal forma que reduzcan al máximo las proliferaciones bacterianas y permitan una limpieza y desinfección adecuada (Cowman y Kelsey, 1992; Hunter, 1993; Jayasekara y col., 1999).

El diseño del pozo fuente, las características de la planta de envasado, la tubería y las maquinarias son factores muy importantes en la tarea de disminuir los puntos de contaminación microbiana (Dege, 2011). Cualquier posibilidad de contaminación a partir de los trabajadores o del medio ambiente debe ser reducida al mínimo nivel (Hunter y Burge, 1987 y Bischosfberger, 1990).

El último punto a controlar es el producto terminado. El laboratorio de la propia planta envasadora u otro laboratorio externo deberán realizar muestreos representativos de cada uno de los lotes, para efectuarles análisis físico-químicos y microbiológicos. Si los resultados son favorables, el producto estará listo para su distribución.

2.5.5. Reglamentación

A través de la historia de la humanidad, la búsqueda de un agua clara, limpia y fresca ha sido una prioridad para el hombre. Durante los últimos 200 años, se han llevado a cabo una serie de esfuerzos para servir a las comunidades

suficiente agua potable, pero sólo durante los últimos 70 años, se han desarrollado criterios de calidad tanto químicos como microbiológicos para el agua de consumo (WHO, 2011).

Cuando se establecieron las relaciones entre enfermedad y consumo de agua, las tecnologías para su desinfección se desarrollaron rápidamente. Paralelamente las autoridades de salud de cada país elaboraron estándares de calidad para el agua potable.

A nivel internacional fue la Organización Mundial de la Salud (WHO) quién fomentó el interés por el estudio de la calidad de las aguas, dando recomendaciones generales sobre las normas que cada país podría adoptar según sus necesidades, clima y posibilidades (WHO, 1972; NAS, 1977; OPS, 1987; WHO, 2006). Así mismo la mayoría de los países establecieron normas para regular la calidad y el análisis de las aguas de fuentes y manantiales. Los organismos internacionales (FAO, WHO, NAS) están de acuerdo en exigir los mismos requerimientos microbiológicos a las aguas minerales naturales que a las aguas de bebida, y a través de su Comité de Aguas Minerales y Naturales, han establecido límites microbiológicos y métodos de análisis para las aguas minerales (WHO-FAO, 1985; CA-WHO-FAO, 1997; WHO, 2003).

De igual forma la Comunidad Económica Europea promulgo en el año 1980 unas directrices sobre la calidad química y microbiológica del agua mineral natural (CE, 1980). Posteriormente, en 1998, se ha publicado una nueva normativa relativa a la calidad de las aguas de consumo humano que incluyen todas las aguas de bebida envasadas. 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. Desde el punto de vista de normas microbiológicas para las aguas minerales naturales se señala que en el punto de emergencia el contenido de microorganismos debe ser el de su población autóctona normal e indicará una protección de la fuente de toda contaminación exterior. A título orientativo no sobrepasará 20 por ml a 20° C y 5 por ml a 37° C. Además debe estar exenta de

parásitos y microorganismos patógenos, *Escherichia coli* y otros coliformes, estreptococos fecales y *Pseudomonas aeruginosa* en 250 ml de muestra y anaerobios esporulados sulfito reductores en 50 ml de agua (CE, 1998).

En los Estados Unidos de Norteamérica la calidad del agua mineral envasada es regulada por el Código de Regulaciones Federales de la Administración de Alimentos y Drogas (FDA). La Legislación Americana no distingue entre aguas envasadas y aguas minerales envasada, las clasifica todas como aguas envasada (FDA, 2000).

En Venezuela las aguas minerales envasadas se rigen de acuerdo a la Normativa v establecida por el Comité Venezolano de Normas Industriales (COVENIN), en donde se establecen las definiciones y los criterios fisicoquímicos y microbiológicos que deben cumplir este tipo de producto (COVENIN, 1982; COVENIN, 1993).

El régimen jurídico de las aguas minerales es aun problemático en muchos países, a pesar de que su explotación y comercialización tiene una notable importancia económica, dado a que algunas normativas la siguen considerando como recurso minero.

2.5.6. Perspectivas

Antes de los años setenta el estudio de la vida en las aguas minerales subterráneas era limitado. A partir de esa década se generó un creciente interés por conocer la vida de estos ambientes y su relación con los procesos y ciclos biológicos. Posteriormente se ha ido conociendo la biodiversidad en estos ambientes y la importancia biológica de los mismos en los procesos de autodepuración y de reciclaje de la materia orgánica, lo cual ha traído como consecuencia que se reconozca el enorme potencial de estos microorganismos para degradar compuestos contaminantes y de allí su gran aplicación en el campo biotecnológico (Madsen y Ghiorse, 1993; Chapelle, 2001y Leclerc y Moreau, 2002; Velez, 2009).

Las investigaciones realizadas hasta la presente fecha indican que las bacterias heterótrofas son los microorganismos dominantes, mientras que los microorganismos eucariotas pueden estar presentes en bajo número. La cadena trófica en los acuíferos es principalmente heterótrofa, relacionada tanto con el flujo de la materia orgánica disuelta y con la materia orgánica sedimentada (De la Rosa y Mosso, 2000; Leclerc y Da Costa, 2004).

Los datos ecológicos, especialmente de diversidad y propiedades fisiológicas de la microbiota de las aguas minerales, aunque muy escasos, son importantes para entender y conocer los riesgos de supervivencia que tienen estos organismos en estos ecosistemas. Por otra parte, y considerando los problemas de inestabilidad en los ecosistemas y de extinción de especies que ha traído el cambio climático, se hace necesario llevar a cabo extensos estudios que determinen y conserven la biodiversidad microbiana presente (Leclerc y Da Costa, 2004)..

Por otra parte, desde un punto de vista microbiológico, es sumamente importante conocer la composición de la microbiota bacteriana que caracteriza a un manantial determinado, ya que dependiendo de ese conocimiento podremos establecer parámetros que nos permitan decidir si un agua de manantial está contaminada, o si cumple con los estándares de calidad higiénica.

Hasta la fecha se han venido aplicando las técnicas convencionales de cultivo e identificación microbiana, para estudiar la población de microorganismos que se encuentran en los ecosistemas acuáticos salinos y no salinos, sin embargo, a medida que se ha progresado en las técnicas de observación microscópica, se va viendo un nuevo mundo de microorganismos que están presentes en estos ecosistemas pero no pueden ser cultivados por las técnicas convencionales, las llamadas "bacterias viables pero no cultivables" (Rappe y Giovannoni, 2003; Giovannoni y Vergin, 2012).

En los últimos años, con el continuo desarrollo alcanzado en las técnicas de biología molecular, se ha podido estudiar este mundo de las bacterias viables no cultivables, y se han descifrado las secuencias genéticas de microorganismos

nuevos para la ciencia, como es el caso de las nuevas bacterias descubiertas en el Mar de los Sargazos, mediante la técnica de secuenciamiento "Shotgun", creada por Craig Venter y su equipo (Venter y col., 2004; Vélez, 2009; Sahah y col., 2010; Temperton y col., 2011; Wu y col., 2011; Smith y col., 2012).

El desarrollo de nuevas herramientas de análisis abre un nuevo mundo de posibilidades para estudiar el verdadero universo de los microorganismos presentes en el agua, en particular de las aguas minerales (Vélez, 2009; Temperton y col., 2011).

Tomando en consideración lo antes señalado, y teniendo en cuenta que en Venezuela ha venido aumentando en los últimos años el consumo de agua mineral envasada, se planteo el presente trabajo de investigación cuyo objetivo fue conocer las especies que conforman la microbiota bacteriana heterótrofa aerobia mesófila viable y los patrones de resistencia antimicrobiana de las principales especies que conforman esta población de bacterias

www.bdigital.ula.ve

3. HIPOTESIS

El agua mineral envasada no es un producto estéril, presenta una microbiota autóctona diversa que depende de las características biológicas, ecológicas, geológicas y fisicoquímicas del agua del manantial o acuífero de donde procede. De igual forma, puede contener una población microbiana alóctona que puede llegar a la misma por problemas de contaminación, tanto de la fuente, como del proceso de envasado. En este sentido, es posible conocer los principales grupos bacterianos que conforman la microbiota bacteriana heterótrofa aerobia mesófila del agua mineral envasada que se expenden y comercializan en las principales ciudades de Venezuela, así como los patrones de resistencia a los antimicrobianos de las principales especies de esta población de bacterias.

www.bdigital.ula.ve

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Conocer los grupos bacterianos que conforman la microbiota bacteriana heterótrofa aerobia mesófila viable de las principales marcas de aguas minerales emvasadas expendidas y comercializadas en diversas ciudades de Venezuela, así como los patrones de resistencia a los antibióticos de las principales especies de bacterias que forman parte de esta microbiota.

4.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Cuantificación y aislamiento de bacterias heterótrofas mesófilas viables, presentes en el agua mineral emvasada.
- Recuento y aislamiento de coliformes totales y fecales, presentes en el agua mineral emvasada.
- Detección y aislamiento de cepas de *Staphylococcus* y *Pseudomonas*, presentes en el agua mineral emvasada.
- Identificación morfológica y bioquímica de las distintas cepas bacterianas aisladas.
- Determinación de los patrones de resistencia antimicrobiana de las principales cepas bacterianas identificadas

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. MATERIALES

5.1.1. Muestras

Se analizaron 38 marcas comerciales de agua mineral envasada que se comercializan en las principales ciudades de Venezuela. La selección de los sitios de muestreos se realizó al azar entre los comercios donde se expenden este tipo de productos, mediante el empleo de una tabla de números aleatorios. Las muestras consistieron de cinco (5) unidades del producto, por cada marca estudiada, conservada en envases de plástico, de 1500 cc de capacidad, y almacenadas a temperatura ambiente hasta su procesamiento en el laboratorio. De esta manera se estudiaron un total de 190 unidades de aguas minerales envasadas.

5.1.2. Medios de cultivo

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 atmósfera de presión durante 20 minutos.

5.1.3. Reactivos

Todos los reactivos que se utilizaron en el presente trabajo fueron de grado analítico.

5. 2. MÉTODOS

5.2.1. Determinación del pH y la temperatura

De cada una de las muestras se tomaron 10 ml y se colocaron en un tubo de vidrio estéril y se les determinó el pH del agua mediante un pHmetro electrónico. De igual forma, se midió la temperatura del agua utilizando un termómetro de una sensibilidad de una décima de grado.

5.2.2. Cuantificación, recuento, aislamiento e identificación de Microorganismos

- **Cuantificación y aislamiento de bacterias heterótrofas aerobias mesófilas viables**

El recuento de bacterias heterótrofas aerobias mesófilas viables se realizó por la técnica de filtración en membrana (APHA, 2005; Ojo y col., 2007). Se utilizaron membranas de acetato de celulosa de 47 mm de diámetro y con un tamaño de poro de 0,45 μm . Se empleó como medio de cultivo, el medio agar R₂A. El volumen de muestra de agua filtrada fue de 100 ml. Finalizado el proceso de filtración, se retiraron los filtros asépticamente de las unidades de filtración y se colocaron sobre la superficie de cajas de Petri contentivas del agar R₂A. Seguidamente se incubaron las cajas de Petri con los filtros durante 5 a 10 días a 30°C. Todos los análisis se realizaron por duplicado. Los resultados se expresaron como medias aritméticas de las unidades formadoras de colonias por cien mililitro de agua (UFC/100mL). Las colonias más representativas y con morfología y fenotipos diferente se aislaron en agar soya tripticasa (TSA) para su posterior identificación.

- **Recuento y aislamiento de coliformes totales y fecales**

Se realizó por la técnica de filtración a través de membrana (ISO, 2000). Se filtraron 100 ml de las muestras de agua a través de un filtro de acetato de

celulosa de 47 mm de diámetro y una porosidad de 0,45 μm , el cual se colocó sobre agar Agar Chapman lactosa-trifenil tetrazolio (TTC) , contenido en una placa Petri. Se incubó a 37° C para coliformes totales y 44,5° C para coliformes fecales durante 24-48 horas. Finalizado el tiempo de incubación se contaron las colonias con brillo metálico en el caso de *Escherichia coli*, y opacas y violetas, en el caso de las otras coliformes como *Enterobacter* y *Klebsiella*, y se expresó el resultado en unidades formadoras de colonias por 100 ml de agua (UFC/100ml). Los análisis se realizaron por duplicado. Las colonias con morfología diferente se sembraron en agar soya tripticasa (TSA) para su posterior identificación.

• **Detección y aislamiento de especies de *Staphylococcus*.**

Para la investigación de *Staphylococcus* se utilizó la técnica de filtración (UNEP/WHO, 1995; APHA, 2005), Se filtraron 100 ml de agua correspondientes a cada una de las muestras, a través de un filtro de acetato de celulosa de 47 mm de diámetro y 0,45 μm de tamaño del poro. El filtro se colocó en la superficie del medio de agar Baird-Parker, el cual se incubó a 37° C durante 24-48 horas. Las colonias crecidas se aislaron en agar TSA para su posterior identificación.

• **Detección y aislamiento de especies de *Pseudomonas*.**

Para estudiar la presencia de cepas de *Pseudomonas* se utilizó la técnica de filtración (COVENIN, 1986; APHA, 2005; ISO, 2006). Se filtró un volumen de 100 ml de muestra de agua, utilizando filtros de acetato de celulosa de 47 mm de diámetro y 0,45 μm del tamaño del poro, los cuales se colocaron en agar cetrimida y se incubaron a 37° C durante 24 horas (ISO, 2006). Las colonias crecidas se aislaron en agar TSA para su posterior identificación.

5.2.3. Identificación de bacterias heterótrofas

Las cepas bacterianas aisladas y purificadas se identificaron por medio de características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas, siguiendo los esquemas de identificación señalados por MacFaddin (2003), Barrow y Feltham, (2004) y

Velazco y col. (2008), para bacterias Gram negativas y Gram positivas. Las pruebas fisiológicas y bioquímicas se realizaron según los procedimientos indicados por Barrow y Feltham (2003) y utilizando en algunos casos las galerías APHI de la Empresa Biomerux. Las pruebas realizadas fueron las siguientes:

- **Tinción de Gram**

A partir de un cultivo de 24 horas a 30° C en agar TSA, se realizó la tinción de Gram por la técnica estándar (Barrow y Feltham, 2004; Velazco y col., 2008).

- **Morfología de la colonia y producción de pigmento**

Se sembró el microorganismo por estría en la superficie del agar TSA. Se incubó a 30 °C durante 24 horas, finalizado la incubación se observaron los siguientes caracteres: tamaño, pigmentación, borde, brillo y elevación (Barrow y Feltham, 2004).

- **Producción de oxidasa**

Se tomó una muestra del cultivo de 24 horas en agar TSA con un palillo estéril y se extendió en una tira de papel impregnada en solución acuosa al 1% de di clorhidrato de tetrametil-*p*-fenilendiamina. Si el microorganismo producía una coloración púrpura, azul oscuro o negro en 30 segundos, se consideró la prueba positiva, caso contrario se consideró negativa (Barrow y Feltham, 2004; Velazco y col., 2008).

- **Producción de la catalasa**

Se emulsionó cada colonia bacteriana asilada en un portaobjeto con agua oxigenada de 10 volúmenes. El desprendimiento de oxígeno en forma de burbujas se consideró como una prueba positiva (Barrow y Feltham, 2004; Velazco y col., 2008).

● Oxidación-fermentación de la glucosa

Se sembraron dos tubos de medio Hugh y Leifson por punción, a partir de un cultivo de cada colonia bacteriana aislada, de 24 horas en agar TSA. Uno de los tubos luego de sembrado se recubrió con parafina estéril. Se incubaron a 37° C durante 72 horas.

La producción de ácido a partir de la glucosa por vía fermentativa se observó en el tubo recubierto con parafina, por un cambio de color en el indicador y la producción de ácido a partir de la glucosa por vía oxidativa se observó en el tubo sin recubrir, igualmente por un cambio de color en el indicador. Las cepas que no modificaron el color se consideraron microorganismos inertes (Barrow y Feltham, 2004; Velazco y col., 2008).

● Tipo respiratorio

Se realizó en el medio de tioglicolato semifluido al que previamente se le eliminó el oxígeno disuelto por ebullición. Se incubó a 37° C durante 48 horas. Se observó el crecimiento en el tubo para determinar el tipo respiratorio (Barrow y Feltham, 2004; Velazco y col., 2008).

● Observación de la movilidad

Se sembró un tubo de agar movilidad, por picadura, e incubando a 37° C, durante 48 horas. Se observó si el crecimiento sobrepasa la línea sembrada (Barrow y Feltham, 2004; Velazco y col., 2008).

5.2.3.1 Identificación de bacilos Gram negativos fermentadores

Para la identificación de las colonias de bacilos Gram negativos fermentadores se siguieron los esquemas de identificación propuestos por MacFaddin (2003), Barrow y Feltham, (2004) y Velazco y col. (2008). Además de las pruebas generales de identificación, se realizaron las pruebas bioquímicas tales como,

siembra en medio de Kligler, producción de indol, producción de aceti-metil carbinol, rojo de metilo, utilización de citrato, desanimación de la fenilalanina, reducción de nitratos, producción de gas de la lactosa, hidrólisis de la esculina, crecimiento en agar MacConkey y las pruebas contenidas en el sistema miniaturizado de pruebas bioquímicas API 20E (BioMérieux, 1990).

- **Siembra en medio Kligler**

Se sembró por picadura y estría, las respectivas colonias aisladas, en tubos con medio Kligler. Se incubó a 37° C durante 24 horas. Finalizado el tiempo de incubación se observó la fermentación de glucosa y lactosa, por cambios en la coloración del medio de cultivo en el fondo y superficie del tubo, respectivamente. De igual forma, la producción de ácido sulfhídrico se evidenció por la aparición de un color negro en el tubo (Barrow y Feltham, 2004; Velazco y col., 2008).

- **Producción de indol**

Las colonias se sembraron en tubos con agua de peptona, incubándose a 37 ° C durante 24 horas. Finalizado la incubación se añadieron de 4 a 5 gotas del reactivo de Kovacs. La aparición de un anillo de color rojo demostró la positividad de la prueba (Barrow y Feltham, 2004; Velazco y col., 2008).

- **Producción de acetil-metil carbinol (Voges-Proskauer)**

Cada unas de las colonias asiladas se sembraron en el medio de Clark y Lubs, incubándose a 37° C durante 48 horas. Finalizada la incubación se añadieron 2 gotas de solución de alfa naftol al 5% en etanol y KOH al 40% y se agitó durante 10 minutos. La reacción se consideró positiva al aparecer una coloración rosa (Barrow y Feltham, 2004; Velazco y col., 2008).

- **Prueba del rojo de metilo**

Se realizó en el mismo medio y condiciones que la prueba de Voges-Proskauer.

Al añadir unas gotas del reactivo rojo de metilo, el viraje a rojo intenso indicó una reacción positiva (Barrow y Feltham, 2004; Velazco y col., 2008).

- **Utilización del citrato**

Cada una de las colonias bacterianas aisladas se sembró en el medio de agar citrato de Simons, incubándose a 37° C durante 24 horas. Finalizado la incubación se observó si existe o no crecimiento en el medio (Barrow y Feltham, 2004; Velazco y col., 2008).

- **Producción de ureasa**

Se sembraron las colonias aisladas por estría en tubo de agar urea de Christensen. Se incubaron a 37° C durante 24 horas. La presencia de ureasa se evidenció por la presencia de un color rojo cereza. Se consideró negativa al ocurrir un cambio de color a amarillo, debido a la producción de sustancias ácidas a partir de la glucosa (Barrow y Feltham, 2004; Velazco y col., 2008).

- **Desanimación de la fenilalanina**

Cada una de las colonias aisladas se sembró en tubos de agar fenilalanina. Se incubaron a 37° C durante 24 horas. Finalizada la incubación se añadieron 5 a 6 gotas de una solución de cloruro férrico. La producción de ácido fenilpirúvico se evidenció por la aparición de un color verde en el plano inclinado (Barrow y Feltham, 2004; Velazco y col., 2008).

- **Reducción de nitratos**

Se realizó sembrando las colonias en caldo nitrado. Se incubó a 37° C durante 24 horas. La investigación de los nitritos se realizó mediante la reacción de Griess, para lo cual se añadieron 2 gotas de ácido sulfanílico y 2 gotas de alfa-naftil amina (Barrow y Feltham, 2004). Se consideró positiva la reacción al aparecer una coloración roja. Cuando no apareció la coloración, se consideró

negativo y se comprobó la presencia de nitratos en el medio añadiendo una pequeña cantidad de zinc. Al existir nitratos en el medio, aparece una coloración roja (Barrow y Feltham, 2004).

- **Producción de gas de la lactosa**

A partir de las colonias aisladas se realizó una siembra en un tubo con caldo lactosado y la presencia de un tubo de Durham. Se incubó a 37° C entre 24 y 48 horas. Se consideró positivo los tubos con gas en el interior de la campana de Durham (Barrow y Feltham, 2004; Velazco y col., 2008).

- **Hidrólisis de la esculina**

A partir de las colonias aisladas se realizaron siembras por estrías en la superficie del agar esculina. Se incubó a 37° C durante 24 a 48 horas. Se consideró positiva la prueba cuando, por desdoblamiento de la esculina en glucosa y esculentina, aparece una coloración parda oscura, debido a la reacción del hierro con la esculentina (Barrow y Feltham, 2004; Velazco y col., 2008).

- **Crecimiento en agar MacConkey**

Se realizaron siembras por agotamiento de cada una de las colonias aisladas en la superficie del agar MacConkey. Se incubaron a 37° C durante 48 horas. Finalizada la incubación se observó el crecimiento de cada colonia (Barrow y Feltham, 2004; Velazco y col., 2008).

- **Galerías API 20E**

Se prepararon las galerías siguiendo las instrucciones del fabricante. Se tomó una colonia aislada de la placa de cultivo y se realizó una suspensión en un tubo con 5 ml de una solución salina estéril, homogeneizando cuidadosamente las bacterias. Posteriormente se inoculó la serie de 20 microtubos de las galerías con la suspensión bacteriana, Las galerías se incubaron durante 24 horas a 37° C.

Finalizado el tiempo de incubación, se le añadió el correspondientes reactivos a los microtubos que lo necesitaban y se procedió a leer visualmente las distintas pruebas, siguiendo el manual de procedimiento de las galerías API. Por último, y de acuerdo a los resultados obtenidos, se procedió a obtener los perfiles taxonómicos de las cepas bacterianas en la base de datos APILAB-Plus versión 3.3.3 (BioMérieux, 1990).

5.2.3.2. Identificación de bacilos Gram negativos no fermentadores

Para la identificación de las colonias Gram negativas no fermentadoras se siguió el esquema de identificación propuestos por MacFaddin (2003), Barrow y Feltham, (2004) y Velazco y col. (2008). Además de las pruebas generales de identificación, se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas: hidrólisis de la esculina, crecimiento a 42° C, producción de pigmentos y las pruebas contenidas en el sistema miniaturizado de pruebas bioquímicas API 20NE (BioMérieux, 1990).

- **Producción de pigmentos**

Se inoculó el microorganismo sobre la superficie de los medios agar King A y B. Se incubaron a 37° C durante 24 horas. La presencia de pigmento verde fluorescente (fluoresceína) se observó en el agar King B y el pigmento azul (piocianina) en el agar King A (Barrow y Feltham, 2004).

- **Crecimiento a 42° C**

Se inoculó el microorganismo en caldo nutritivo. Se incubó a 42° C durante 48 horas. Se observó la presencia o ausencia de crecimiento (Barrow y Feltham, 2004; Velazco y col., 2008).

- **Hidrólisis de la esculina**

Se realizó según se describió en el apartado de identificación de bacilos Gram

negativos fermentadores (Barrow y Feltham, 2004; Velazco y col., 2008).

- **Producción de ureasa**

Se realizó según se describió en el apartado de identificación de bacilos Gram negativos fermentadores (Barrow y Feltham, 2004; Velazco y col., 2008).

- **Desnitrificación de nitratos**

Se realizó de igual forma que los nitratos empleando el mismo medio pero introduciendo en los tubos una campana de Durham para observar la formación de gas, nitrógeno o amoníaco. Se incubó a 30° C de 2 a 7 días (Barrow y Feltham, 2004).

- **Galerías API 20NE**

Se prepararon las galerías siguiendo las instrucciones del fabricante y se procedió de igual forma que lo señalado para el caso de las galerías API 20E (BioMérieux, 1990).

5.2.3.3 Identificación de bacilos Gram positivos.

La identificación de los bacilos Gram positivos se realizó de acuerdo a los esquemas de identificación propuestos por MacFaddin (2003), Barrow y Feltham, (2004) y Velazco y col. (2008). Se realizaron las pruebas generales de bacterias y además las siguientes pruebas: observación de la morfología y posición de la espora, hidrólisis del almidón, gelatina y las contenidas en las galerías API 50 CH (BioMérieux, 1990). Para los bacilos irregulares además se utilizó el sistema miniaturizado de pruebas bioquímicas API Coryne (BioMérieux, 1990).

- **Observación de la morfología y posición de la espora**

Se realizó la tinción de esporas por el método de Wirtz modificado. Se observó la

forma y posición de la espora (Barrow y Feltham, 2004).

- **Hidrólisis del almidón**

Se inoculó una suspensión de la colonia bacteriana en el medio agar almidón. Se incubó a 30° C durante 8 días. Cuando el desarrollo de la colonia fue suficiente, se añadieron 3 gotas de solución de yodo yodurado. Se consideró positiva la hidrólisis del almidón cuando alrededor de la colonia apareció una zona clara (Barrow y Feltham, 2004).

- **Hidrólisis de la gelatina**

Se realizó inoculando el microorganismo en el centro de una placa con medio agar gelatina. Se incubó a 30° C durante 8 días. Cuando la colonia estuvo lo suficientemente desarrollada se recubrió la superficie del medio con unas gotas de cloruro mercurio (Barrow y Feltham, 2004). Se consideró la prueba positiva al producirse un halo claro alrededor de la colonia.

- **Galerías API Coryne**

Se prepararon las galerías siguiendo las instrucciones del fabricante y se procedió de igual forma que lo señalado para el caso de las galerías API 20E (BioMérieux, 1990).

5.2.3.4. Identificación de cocos Gram positivos.

Para la identificación de los cocos Gram positivos, además de las pruebas generales de la catalasa, oxidasa y Oxidación/Fermentación, se realizaron las pruebas de crecimiento en agar bilis-esculina, hidrólisis del hipurato, crecimiento en presencia de NaCl al 6,5 %, crecimiento en agar sangre, la prueba del PYR, prueba de la coagulasa y crecimiento en el agar manitol salado (Barrow y Feltham, 2004).

Para el caso de las cepas de *Staphylococcus* se complementó con las pruebas bioquímicas de la galería API-Staph (Biomeraux).

- **Crecimiento en agar sangre**

Las hemolisinas son enzimas que lisan los hematíes. Las bacterias que producen estas enzimas presentan un halo transparente alrededor de las colonias a consecuencia de la lisis de los hematíes. Para esta prueba se utilizó agar sangre. Cada una de las colonias a identificar se sembró por agotamiento en estría en placas de agar sangre incubándose a 37 °C, durante 24 a 48 horas. Al observar un halo de color verde alrededor de la zona de siembra se consideró como hemólisis alfa y cuando se evidenció un halo transparente alrededor de la colonia, como hemólisis beta (Velazco y col., 2008)

- **Hidrólisis del hipurato**

El hipurato es un compuesto orgánico aromático que puede ser hidrolizado enzimáticamente originando benzoato y glicina. Para realizar esta prueba se sembró una suspensión de cada una de las colonias aisladas en una solución de hipurato y se incubó por 2 horas a 37 °C. Finalizada la incubación se le añadió dos gotas del reactivo de nihidrina. Se consideró como reacción positiva cuando apareció un color púrpura producto de la reacción de la glicina producida enzimáticamente con la nihidrina. La reacción fue negativa cuando no se evidenció cambio de color (Barrow y Feltham, 2004).

- **Prueba de bilis-esculina**

Esta prueba se realizó de manera similar a lo indicado en el punto de la identificación de bacterias Gram negativas, bacilos no fermentadores.

- **Prueba de la coagulasa**

La coagulasa es una enzima que posee actividad similar a la de la protrombina y

es capaz de convertir el fibrinógeno en fibrina lo cual resulta de la formación de un coágulo visible a simple vista, la enzima presente en los microorganismos puede encontrarse de dos maneras diferentes, la forma libre y la ligada, teniendo cada una de ellas propiedades diferentes por lo que su detección requiere de distintos procedimientos, la coagulasa ligada se detecta por el método del portaobjeto esta enzima está unida a la pared celular bacteriana y no está presente en los filtrados de cultivo, cuando las células bacterianas son resuspendidas en una porción de plasma, las fibrillas de fibrina que se forman entre las células provoca la aglutinación de las mismas lo que resulta en la aparición de agregados visibles a simple vista, la coagulasa libre está presente en los filtrados de cultivos y se detecta por el método del tubo de ensayo. Para esta prueba se tomó un tubo de hemólisis contentivo de 2 ml de plasma citratado al cual se le añadió una suspensión del cultivo bacteriano a identificar (Ramírez y col, 2008). Se incubó por dos horas a 37 °C, después de la incubación se observó la formación de un coágulo.

5.2.4. Criterios de clasificación

Las cepas bacterianas aisladas se clasificaron siguiendo los criterios taxonómicos del Manual de Bergey (Krieg y Holt, 1984; Sneath y col., 1986; Staley y col., 1989; Williams y col., 1989; Holt y col., 1994) y la nomenclatura del Comité Internacional de Sistemática Bacteriana (ICSB) publicadas en el International Journal of Systematic Bacteriology.

5.2.5. Identificación molecular de cepas bacterianas

Algunas de las cepas bacterianas que no pudieron ser identificadas por las técnicas convencionales de identificación microbiana, o cuyo perfil numérico API, fue menor del 50 %, se les identificó mediante el método de biología molecular que utiliza la comparación de la secuencia nucleotídica de los genes del ARNr 16S.

Las cepas en estudio se sembraron en primer lugar en el medio MLD, incubándose a 37 °C durante 12 horas. Finalizado el tiempo de incubación se tomo un volumen de 1,5 ml de cultivo y se centrifugo a 10000 g durante 2 minutos. Seguidamente el pellet celular se resuspendió en 400 µl de buffer TE (pH 7,5) y se le agregaron 50 µl de SDS (10%) y 25 µl de Proteinasa K (10 mg/ml). Se incubo durante una hora a 30 °C y se paso la suspensión a través de una Jeringa de insulina de cinco a seis veces. El material se extrajo dos veces con 500 µl de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) y se centrifugo a 11000 g durante 5 minutos. Seguidamente, se realizo una extracción con 500 µl de cloroformo y se centrifugo a 11000 g durante 5 minutos. La precipitación del ADNg se realizo con 1/10 de volumen de acetato de sodio y 1 volumen de isopropanol al 99%. La suspensión se mantuvo a -20 °C durante 12 horas, y posteriormente se centrifugo durante 15 minutos a 14000 g. El pellet obtenido se lavo con 500 µl de etanol al 70% y se centrifugo a 10000 g durante 5 minutos. Después de secar al aire se resuspendió el material obtenido en 100 µl agua desionizada estéril y se le agrego un volumen de 5 µl de RNasa (5mg/ml en TE). Se incubo durante 30 minutos a 37 °C (Gerhardt, 1994 Sambrook y Russel, 2001).

La purificación se confirmo mediante visualización del ADNg en geles de agarosa al 0,7 %, coloreados con bromuro de etidio (Gerhardt, 1994).

La identificación molecular consistió en la amplificación del gen ADNr 16S por medio de PCR, utilizando los primers bacterianos universales 27F (5'AGAGTTTGATC CTGGCTCAG3') y 1492R (5'GGTTACCTTGTTACGACTT3') (Lane, 1991; Turner y col., 1999; Dekio y col., 2005).

Las reacciones de amplificación fueron preparadas para un volumen total de 10 µl, conteniendo: 5 µl de GoTaq® Green Master mix (Promega), 2 µl (0,1µg/µl) de cada primer y 4,6 µl de agua destilada estéril, siguiendo las recomendaciones del fabricante (Promega).

Las amplificaciones por PCR se realizaron en un Termociclador Applied Biosystems 2720 con el programa siguiente: desnaturalización a 95 °C por 10

minutos, seguida por 30 ciclos de 94 °C por 45 segundos, 51 °C por 45 segundos y 72 °C por 1.5 minutos por ciclo, y un paso de extensión final por 10 minutos a 72 °C (Dekio y col., 2005, Batisson y col., 2009).

Posteriormente, se llevó a cabo la purificación del ADN amplificado, según el protocolo descrito por Sambrook y Russell (2001), realizándole las siguientes modificaciones: Al producto de PCR restante, luego de emplear 3 µl para su visualización en el gel de agarosa, se le agregó agua destilada estéril hasta completar un volumen de 100 µl. A continuación, se le adicionó un volumen de acetato de amonio 10M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto (100% v/v). Esta mezcla se dejó precipitar por 10 minutos, y se descartó el sobrenadante. El precipitado de ADN se llevó a 1 ml de etanol al 70% v/v dos veces, centrifugando por 10 minutos y 5 minutos a 13.4 rcf, respectivamente. Luego se procedió a secar el sedimento (pellet) a temperatura ambiente, y se resuspendió en 11 µl de agua destilada estéril.

Para la verificación de la presencia y la calidad del ADN luego de la purificación, se procedió a visualizar el producto precipitado ya resuspendido en un gel horizontal de agarosa al 0.8%, con 50 ng/ml de bromuro de etidio, cargando 1 µl del producto purificado luego de combinarlo con 1µl de buffer de carga 6X (Promega, Cat. G190A) y 4 µl de agua destilada estéril.

Los productos purificados se enviaron a secuenciar usando el primer forward (27F), en MacroGen Inc. (Korea). Posteriormente, con las secuencias obtenidas se generaron contigs en el programa BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall 1999). Luego se realizó un análisis de similitud entre las secuencias donde se compararon dichos contigs, usando la herramienta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Zhang y col., 2000), con las secuencias publicadas en las bases de datos del GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.gov/Blast.cgi>) (Johnson y col., 2008).

La identidad bacteriana fue asignada tomando en cuenta los resultados obtenidos de la comparación de las secuencias con la base de datos, usando como parámetro de identidad "max ident" 85% (Stackebrandt y Ebers 2006) y una

cobertura en el alineamiento de secuencias (“query coverage”) 98% en el BLAST (Nucleotide Blast) con Nucleotide collection dentro del GenBank (NCBI).

5.2.6. Determinación de perfiles de resistencia antimicrobiana

Para determinar el perfil de resistencia antimicrobiana de las cepas bacterianas aisladas e identificadas, se utilizó el método de difusión en agar de Kirby-Bauer (Clavell y col., 1992).

Placas con agar Muller Hinton (MH) fueron inoculadas mediante un hisopo estéril utilizando suspensiones con una turbidez 0,5 McFarland de las cepas aisladas. Para la inoculación se sumergió un hisopo estéril en el cultivo y se eliminó el exceso rotándolo firmemente contra la pared interna del tubo. El hisopo se frotó el sobre la superficie del medio de cultivo, esta operación se repitió por tres veces sucesivas, rotando la placa para obtener una dispersión uniforme del inóculo en toda la superficie, se dejó secar el inóculo por 5 minutos y se colocaron los discos de antibióticos sobre el agar mediante pinzas estériles. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas.

Una vez finalizada la incubación se midió el diámetro de inhibición de crecimiento y se llevó a cabo la lectura e interpretación de los resultados. Se utilizaron como cepas de control, cepas de referencia de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. La prueba se interpretó de acuerdo a las recomendaciones del CLSI (2005).

5.2.7. Tratamiento estadístico de los resultados

Los resultados obtenidos en las pruebas cuantitativas se agruparon en tablas y graficas. Los datos se ordenaron en tablas de rango, valor mínimo, valor máximo, promedio y desviación estándar. Se realizaron las determinaciones de media y desviación estándar utilizando el programa Excel 2010.

6. RESULTADOS

En primer lugar y tomando en consideración la importancia del pH en el crecimiento de los microorganismos, se determinaron sus valores en cada una de las muestras de agua mineral envasada, una vez en el laboratorio y antes de realizar las pruebas microbiológicas.

No hubo diferencias significativas en el valor de los pH valorados en cada una de las muestras analizadas, estando todos los valores dentro del rango de pH neutro (7.2 a 7.5) y en concordancia con lo expresado en cada una de las etiquetas de los envases.

En relación a la temperatura, es importante señalar que las muestras no fueron refrigeradas y se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su análisis en el laboratorio. Sin embargo, antes de su análisis se le determinó a cada una de ellas el valor de la temperatura, fluctuando las mismas entre 18 y 20 ° C.

En el presente trabajo se determinó y cuantificó la presencia de grupos microbianos considerados como indicadores de calidad sanitaria.

Los resultados obtenidos en la cuantificación del número de bacterias heterótrofas aerobias mesófilas, coliformes totales, coliformes fecales y *Pseudomonas aeruginosa* se resumen en las tablas 1, 2, 3 y 4, respectivamente.

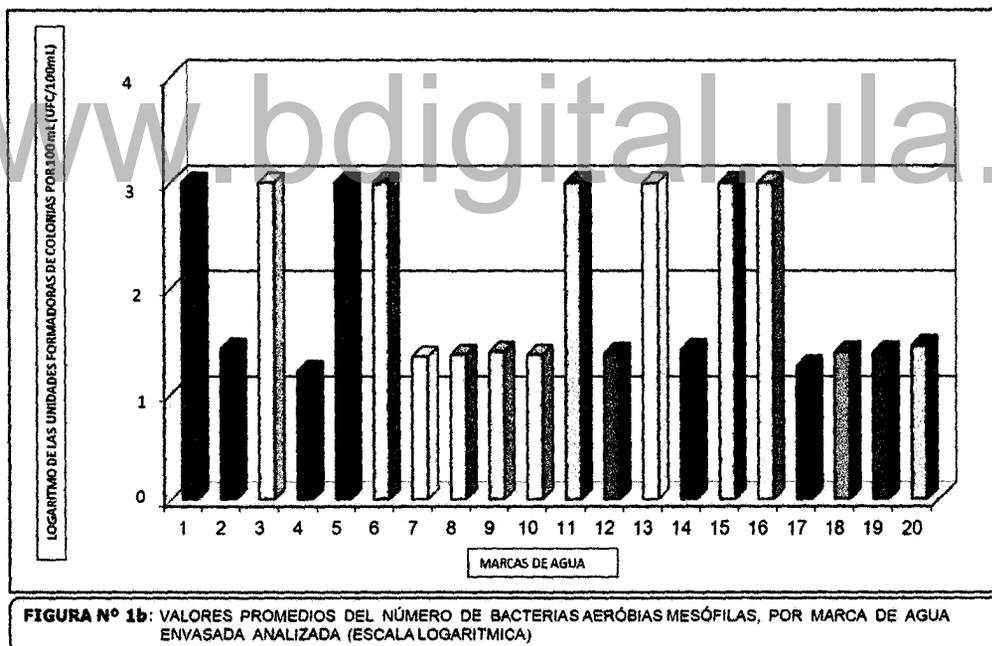
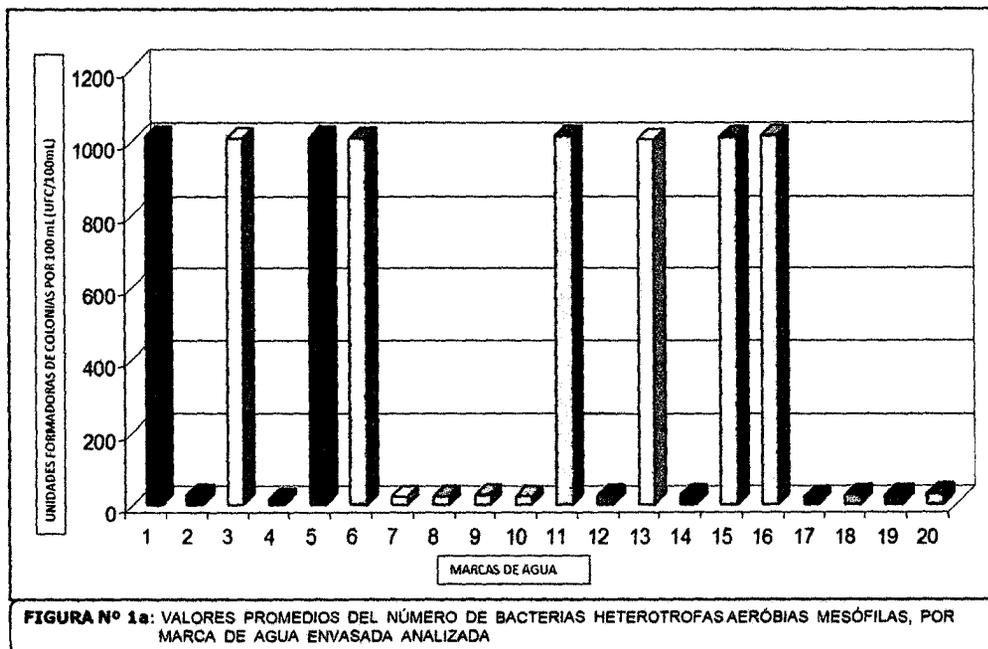
Al observar los datos expuestos en la tabla 1 y figuras 1a y 1b se puede señalar respecto a las bacterias heterótrofas aerobias mesófilas, que las mismas se lograron detectar en 20 de las 38 marcas de agua estudiadas, es decir en el 52,63 % del total de marcas estudiadas. En lo que respecta a las unidades de muestra analizadas, se pudo confirmar y cuantificar su presencia en 100 (52,63 %) de las 190 muestras de agua mineral envasadas valoradas.

TABLA N° 1: VALORES DESCRIPTIVOS GLOBALES DEL NÚMERO DE BACTERIAS HETEROTROFAS AERÓBIAS MESÓFILAS, POR MARCA DE AGUA ENVASADA ANALIZADA.

MARCA DE AGUA	VALOR MAXIMO (UFC/100mL)	VALOR PROMEDIO (UFC/100mL)	VALOR MINIMO (UFC/100mL)	DESVIACION ESTANDAR (UFC/100mL)	LOGARITMO (UFC/100mL)
A	> 2000	1012,5	25	1396,54	3,0054
B	37	27	17	14,14	1,4314
C	> 2000	1009,5	19	1400,78	3,0041
D	19	16,5	14	3,54	1,2174
E	> 2000	1011,5	23	1397,95	3,0050
F	> 2000	1007,5	15	1403,61	3,0032
G	29	22,5	16	9,19	1,3522
H	0	0	0	0	0
I	0	0	0	0	0
J	0	0	0	0	0
K	32	23,5	15	12,02	1,3711
L	33	25	17	11,31	1,3979
M	29	23,5	18	7,78	1,3711
N	0	0	0	0	0
O	0	0	0	0	0
P	0	0	0	0	0
Q	0	0	0	0	0
R	> 2000	1016,5	33	1390,88	3,0071
S	34	24,5	15	13,44	1,3892
T	> 2000	1005,5	11	1406,44	3,0024
U	0	0	0	0	0
V	34	26,5	19	10,61	1,4232
W	0	0	0	0	0
X	0	0	0	0	0
Y	0	0	0	0	0
Z	0	0	0	0	0
A1	> 2000	1012,5	25	1396,54	3,0054
B1	0	0	0	0	0
C1	0	0	0	0	0
D1	> 2000	1014,5	29	1393,71	3,0063
E1	0	0	0	0	0
F1	0	0	0	0	0
G1	0	0	0	0	0
H1	26	18,5	11	10,61	1,2672
I1	0	0	0	0	0
J1	31	25	19	8,49	1,3979
K1	32	25	18	9,90	1,3979
L1	36	29	22	9,90	1,4624

UFC/100mL: Unidades Formadoras de Colonias en 100 mL de agua

En 90 (47,37%) muestras del agua mineral envasada no se logró detectar la presencia de bacterias heterótrofas aerobias mesófilas, así como en 18 marcas del total analizado (Tabla 1).



Los valores obtenidos para las bacterias heterótrofas aerobias mesófilas, en las muestras donde se pudo determinar, fluctuaron entre 11 UFC/100 ml a >2000 UFC/100 ml, con valores entre 11 y 1016,5 UFC/100 ml (Tabla 1 y figuras 1a y 1b).

En relación al grupo de los coliformes totales, otro de los indicadores bacterianos investigados, los resultados resumidos en la tabla 2 señalan que los mismos estuvieron presentes en 99 (52,11%) de las 190 muestras de agua mineral envasadas analizadas, correspondientes a 20 de las 38 marcas de agua estudiadas.

TABLA N° 2: VALORES DESCRIPTIVOS GLOBALES DEL NÚMERO DE COLIFORMES TOTALES POR MARCA DE AGUA ENVASADA ANALIZADA.

MARCA DE AGUA	VALOR MAXIMO (UFC/100mL)	VALOR PROMEDIO (UFC/100mL)	VALOR MINIMO (UFC/100mL)	DESVIACION ESTANDAR	LOGARITMO (UFC/100mL)
A	19	12,5	6	9,19	1,0969
B	21	13,5	6	10,61	1,1303
C	15	13,5	12	2,12	1,1303
D	6	4,5	3	2,12	0,6532
E	16	10,5	5	7,78	1,0212
F	17	11,5	6	7,78	1,0607
G	16	11	6	7,07	1,0414
H	0	0	0	0	0
I	0	0	0	0	0
J	0	0	0	0	0
K	18	11,5	5	9,19	1,0607
L	19	12	5	9,9	1,0792
M	18	14,5	11	4,95	1,1614
N	0	0	0	0	0
O	0	0	0	0	0
P	0	0	0	0	0
Q	0	0	0	0	0
R	24	16,5	9	10,61	1,2175
S	30	21	12	12,73	1,3222
T	22	16	10	8,49	1,2041
U	0	0	0	0	0
V	18	13	8	7,07	1,1139
W	0	0	0	0	0
X	0	0	0	0	0
Y	0	0	0	0	0
Z	0	0	0	0	0
A1	> 2000	1008,5	17	1402,19	3,0037
B1	0	0	0	0	0
C1	0	0	0	0	0
D1	> 2000	1008,5	17	1402,19	3,0037
E1	0	0	0	0	0
F1	0	0	0	0	0
G1	0	0	0	0	0
H1	22	14	6	11,31	1,1461
I1	0	0	0	0	0
J1	26	15,5	5	14,85	1,1903
K1	21	16	11	7,07	1,2041
L1	20	16	12	5,66	1,2041

UFC/100mL: Unidades Formadoras de Colonias en 100 mL de agua

En 91 (47,89%) muestras del agua mineral envasada no se logró detectar la presencia de bacterias del grupo de coliformes totales (Tabla 2).

Los valores para las bacterias coliformes totales, en donde se logró detectar su presencia, fluctuaron entre 3 UFC/100 ml a >2000 UFC/100 ml, con valores promedios entre 4,5 y 1008,5 UFC/100 ml (Tabla 2 y figuras 2a y 2b).

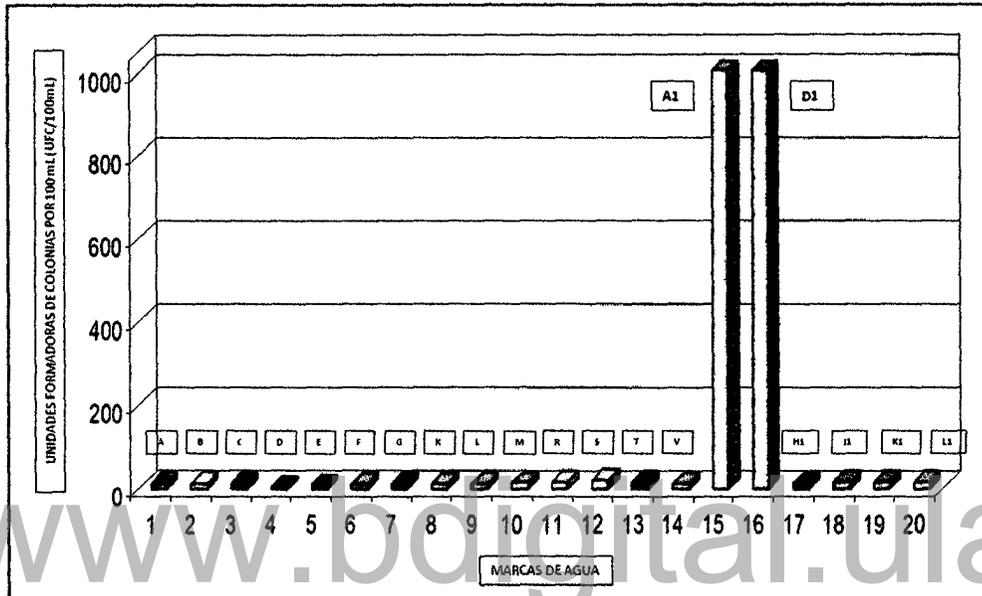


FIGURA Nº 2a: VALORES PROMEDIOS DEL NÚMERO DE COLIFORMES TOTALES POR MARCA DE AGUA ENVASADA ANALIZADA

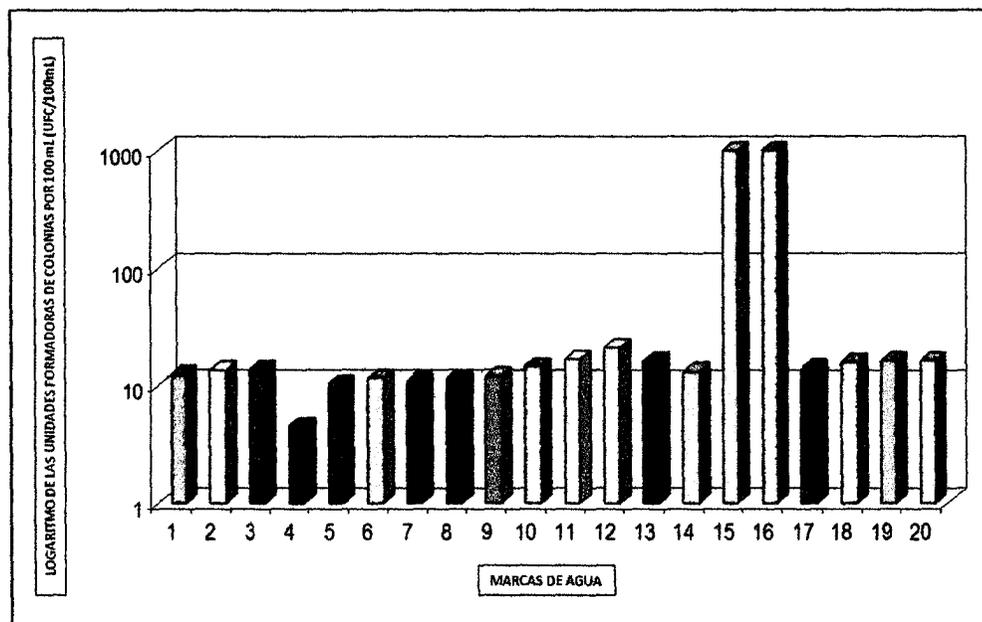


FIGURA Nº 2b: VALORES PROMEDIOS DEL NÚMERO DE COLIFORMES TOTALES POR MARCA DE AGUA ENVASADA ANALIZADA (ESCALA LOGARITMICA)

TABLA Nº 3. VALORES DESCRIPTIVOS GLOBALES DEL NÚMERO COLIFORMES FECALES POR MARCA DE AGUA ENVASADA ANALIZADA.

MARCA DE AGUA	VALOR MAXIMO (UFC/100mL)	VALOR PROMEDIO (UFC/100mL)	VALOR MINIMO (UFC/100mL)	DESVIACION ESTANDAR	LOGARITMO (UFC/100mL)
A	5	3,5	2	2,12	0,5440
B	11	7	3	5,66	0,8451
C	3	1,5	0	2,12	0,1761
D	3	1,5	0	2,12	0,1761
E	7	4,5	2	3,54	0,6532
F	6	4,5	3	2,13	0,6532
G	7	4,5	2	3,54	0,6532
H	0	0	0	0	0
I	0	0	0	0	0
J	0	0	0	0	0
K	9	4,5	0	6,36	0,6532
L	12	7	2	7,07	0,8451
M	12	7,5	3	6,36	0,8751
N	0	0	0	0	0
O	0	0	0	0	0
P	0	0	0	0	0
Q	0	0	0	0	0
R	7	4,5	2	3,54	0,6532
S	12	7,5	3	6,36	0,8751
T	19	12,5	6	9,19	1,0969
U	0	0	0	0	0
V	12	7,5	3	6,36	0,8751
W	0	0	0	0	0
X	0	0	0	0	0
Y	0	0	0	0	0
Z	0	0	0	0	0
A1	> 2000	1004,5	9	1407,85	3,0019
B1	0	0	0	0	0
C1	0	0	0	0	0
D1	35	21	7	19,8	1,3222
E1	0	0	0	0	0
F1	0	0	0	0	0
G1	0	0	0	0	0
H1	14	8,5	3	7,78	0,9294
I1	0	0	0	0	0
J1	7	8	9	1,41	0,9031
K1	17	11,5	6	7,78	1,0607
L1	12	8	4	5,66	0,9031

UFC/100mL: Unidades Formadoras de Colonias en 100 mL de agua

Otro de los grupos bacterianos evaluados fue el de los coliformes fecales, los valores obtenidos para este indicador de calidad sanitaria se resume en la tabla 3 y figuras 3a y 3b, donde se puede observar que los mismos estuvieron presentes en 88 (46,32%) de las 190 muestras de agua mineral emvasadas estudiadas, correspondientes a 20 de las 38 marcas de aguas valoradas.

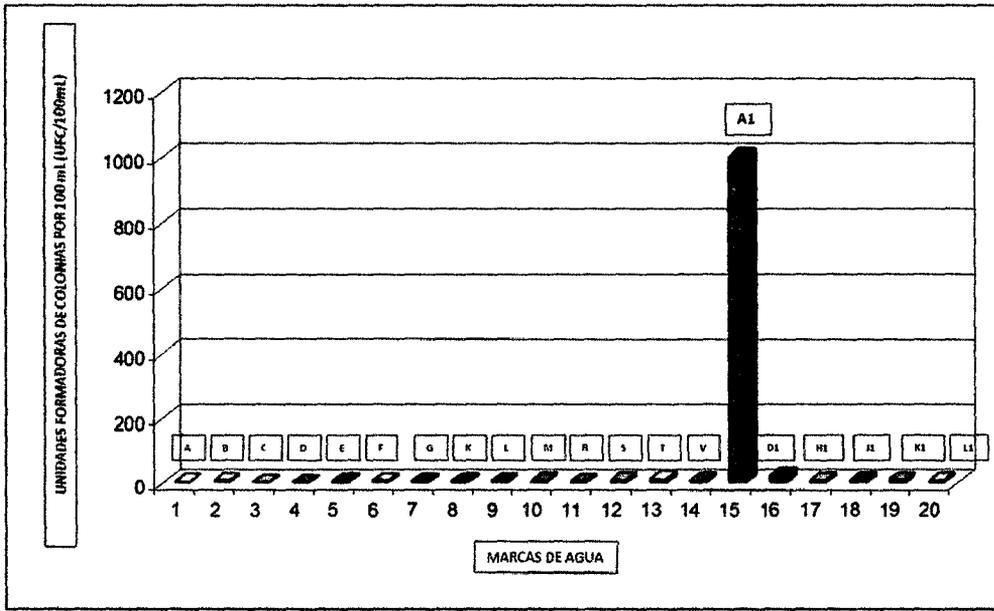


FIGURA N° 3b. VALORES DESCRIPTIVOS GLOBALES DEL NÚMERO DE COLIFORMES FECALES POR MARCA DE AGUA ENVASADA ANALIZADA.

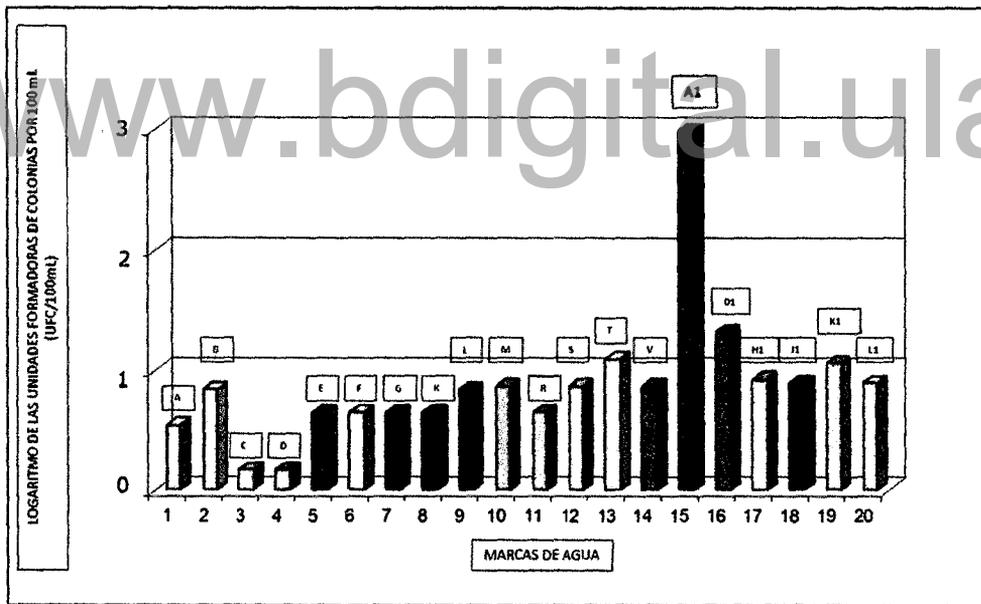


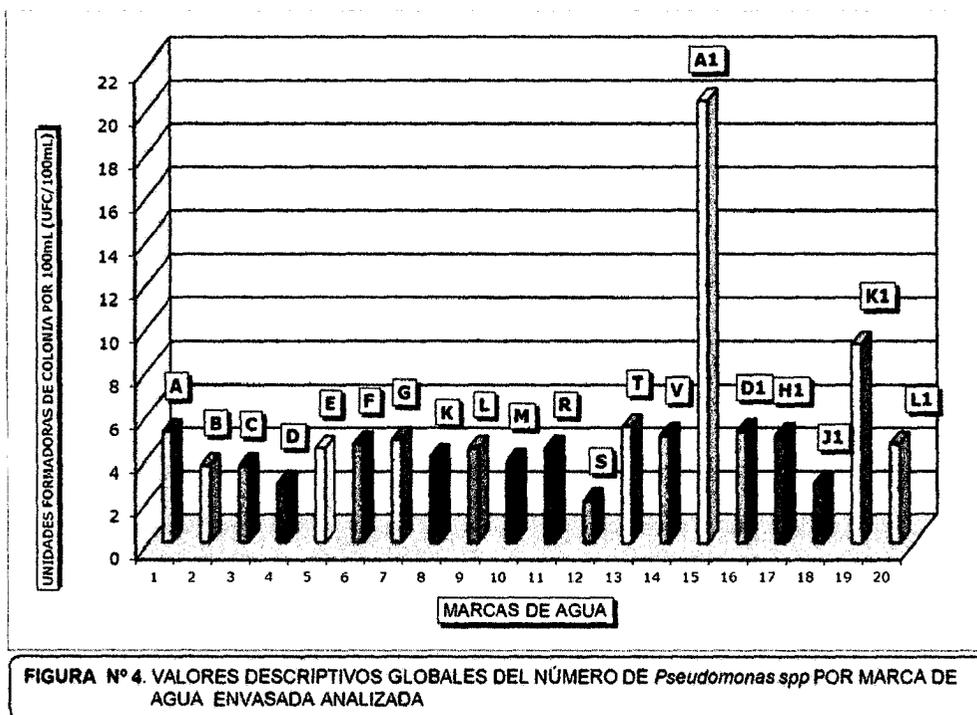
FIGURA N° 3b. VALORES DESCRIPTIVOS GLOBALES DEL NÚMERO DE COLIFORMES FECALES POR MARCA DE AGUA ENVASADA ANALIZADA (ESCALA LOGARITMICA)

En 102 (53,68%) muestras del agua mineral envasada no se logró detectar la presencia de bacterias del grupo de coliformes fecales (Tabla 3).

Los valores para las bacterias coliformes fecales, en las muestras, fluctuaron entre 2 UFC/100 ml a >2000 UFC/100 ml, con valores promedios entre 1,5 y 1004,5 UFC/100 ml (Tabla 3 y figuras 3a y 3b).

TABLA N° 4. VALORES DESCRIPTIVOS GLOBALES DEL NÚMERO <i>Pseudomonas spp</i> POR MARCA DE AGUA ENVASADA ANALIZADA.				
MARCA DE AGUA	VALOR MAXIMO	VALOR PROMEDIO	VALOR MINIMO	DESVIACION ESTANDAR
A	13	6,5	0	9,19
B	7	3,5	0	4,95
C	6	3,0	0	4,24
D	6	3	0	4,24
E	6	4,5	3	2,12
F	7	4,5	2	3,54
G	12	7,0	2	7,07
H	0	0	0	0
I	0	0	0	0
J	0	0	0	0
K	9	5,5	2	4,95
L	13	6,5	0	9,19
M	7	4	1	4,24
N	0	0	0	0
O	0	0	0	0
P	0	0	0	0
Q	0	0	0	0
R	7	4,5	2	3,54
S	5	2,5	0	3,54
T	13	6,5	0	9,19
U	0	0	0	0
V	14	7	0	9,9
W	0	0	0	0
X	0	0	0	0
Y	0	0	0	0
Z	0	0	0	0
A1	31	21,5	12	13,44
B1	0	0	0	0
C1	0	0	0	0
D1	9	5,5	2	4,95
E1	0	0	0	0
F1	0	0	0	0
G1	0	0	0	0
H1	13	6,5	0	9,19
I1	0	0	0	0
J1	7	3,5	0	4,95
K1	15	9,5	4	7,78
L1	7	5	3	2,83

UFC/100mL: Unidades Formadoras de Colonias en 100 mL de agua



Desde un punto de vista sanitario, además de las bacterias del grupo coliformes es importante determinar en el agua la presencia de *Pseudomonas aeruginosa*. Los resultados obtenidos en la cuantificación del número de *Pseudomonas spp.*, presentes en el agua mineral envasada se resumen en la tabla 4 y figura 4.

Al examinar los datos de la tabla 4 y figura 4, respecto a *Pseudomonas spp.*, se puede señalar que la misma se logró detectar en 82 (43,16%) de las 190 muestras analizadas, correspondiente a 20 de las 38 marcas de agua mineral estudiadas.

En 108 (56,84%) muestras del agua mineral envasada no se detectó la presencia de bacterias del género *Pseudomonas* (Tabla 4 y figura 4).

Los valores para *Pseudomonas spp.*, en las muestras detectadas, fluctuaron entre 1 a 31 UFC/100 ml, con valores promedios entre 2,5 y 22,5 UFC/100 ml (Tabla 4 y figura 4).

Los valores en la desviación estándar de los datos obtenidos para todas las determinaciones microbiológicas realizadas, señalan una alta variabilidad en los valores obtenidos (Tablas 1, 2, 3 y 4).

Paralelamente a la cuantificación de la población de bacterias presentes, se aislaron las principales colonias crecidas en la cuantificación de las bacterias heterótrofas aerobias mesófilas, los resultados obtenidos de los aislamientos para cada marca estudiada se resumen en la tabla 5 y figura 5..

TABLA N° 5. TIPOS DE BACTERIAS HETEROTROFAS AEROBIAS AISLADAS (NUMERO DE AISLADOS) EN CADA MARCA DE AGUA ENVASADA ANALIZADA SEGÚN SU MORFOLOGIA

MARCA	BACILOS GRAM (-)	COCOS GRAM (+)	MARCA	BACILOS GRAM (-)	COCOS GRAM (+)
A	12	1	T	6	2
B	12	1	U	0	0
C	10	2	V	5	2
D	7	3	W	0	0
E	11	1	X	0	0
F	11	0	Y	0	0
G	12	1	Z	0	0
H	0	0	A1	10	1
I	0	0	B1	0	0
J	0	0	C1	0	0
K	9	3	D1	8	6
L	9	3	E1	0	0
M	9	0	F1	0	0
N	0	0	G1	0	0
O	0	0	H1	9	2
P	0	0	I1	0	0
Q	0	0	J1	4	5
R	7	2	K1	7	2
S	10	0	L1	6	3

BGN: 174 + **CGP: 40** → **SUBTOTAL: 214** → **TOTAL: 268** ← **NI: 54**

BGN: BACILO GRAM NEGATIVO; **CGP:** COCO GRAM POSITIVO; **NI:** NO IDENTIFICADAS

Al observar los resultados que se presentan en la tabla 5 podemos indicar que se lograron aislar un total de 268 colonias bacterianas, lográndose identificar 214 colonias (79,90 %), correspondiendo 174 cepas (64,93%) a bacterias Gram negativas, y 40 (14,93%) a bacterias Gram positivas. No se pudieron identificar 54 colonias (20,15 %) (Figura 5).

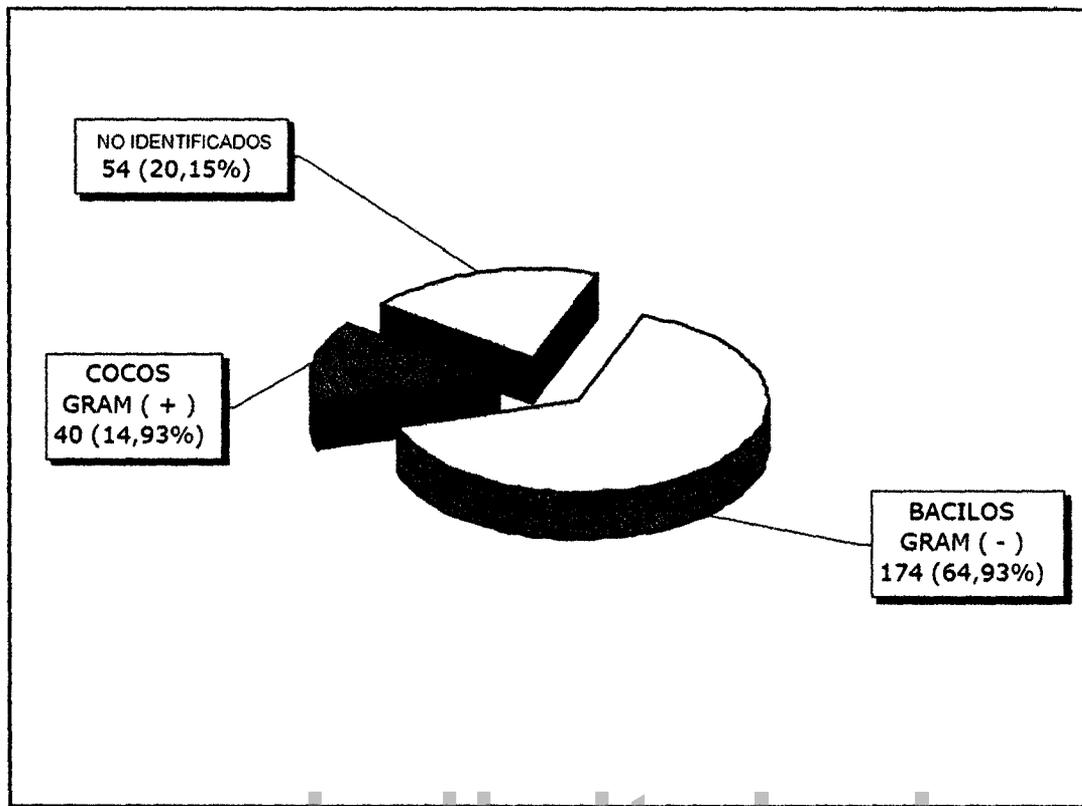


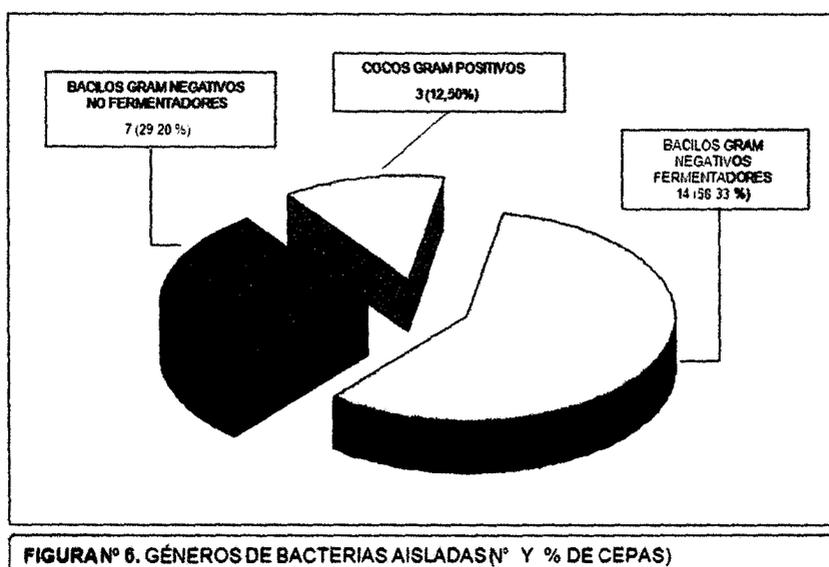
FIGURA N° 5. TIPOS DE BACTERIAS HETEROTROFAS AEROBIAS AISLADAS

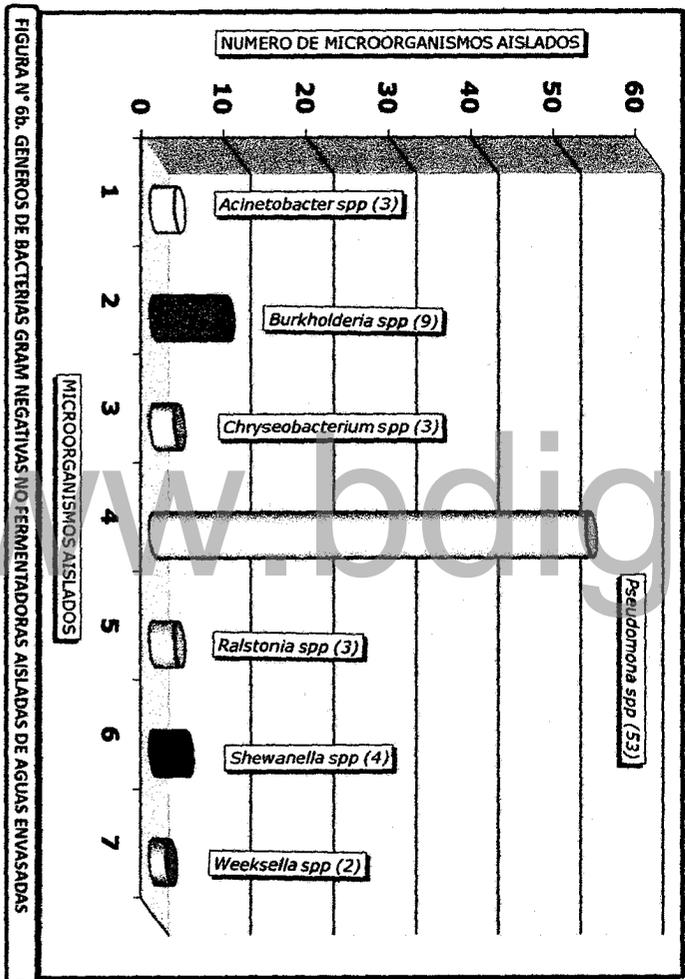
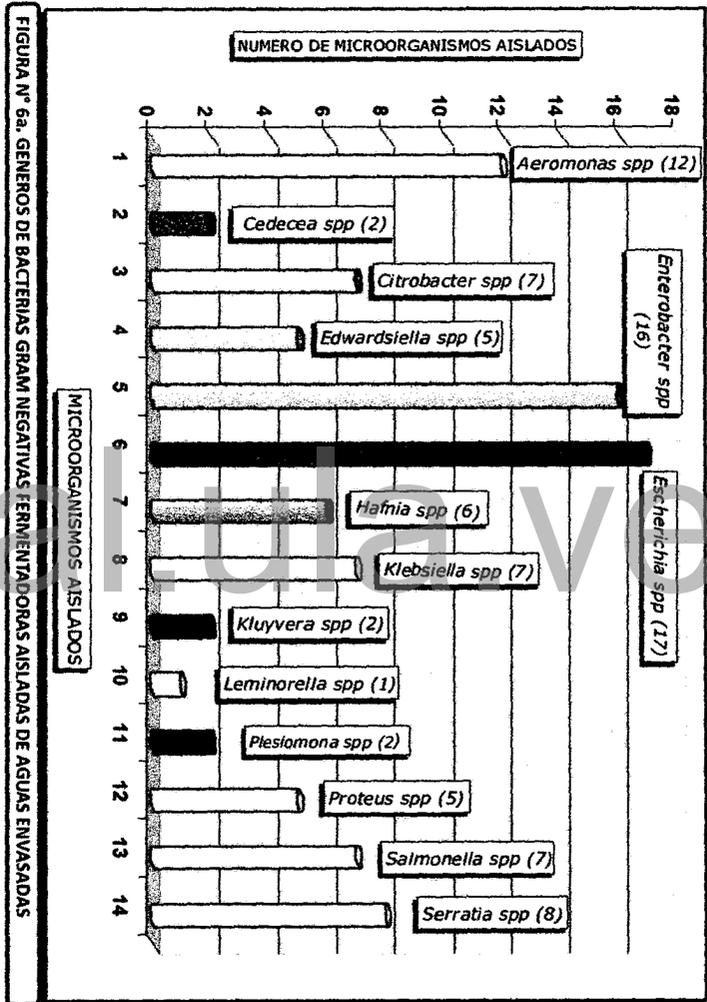
Una vez obtenida la clasificación de las bacterias como Gram negativas o Gram positivas, se llevó a cabo la identificación taxonómica a nivel de género, de las 214 colonias bacterianas aisladas, purificadas y coloreadas. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 6.

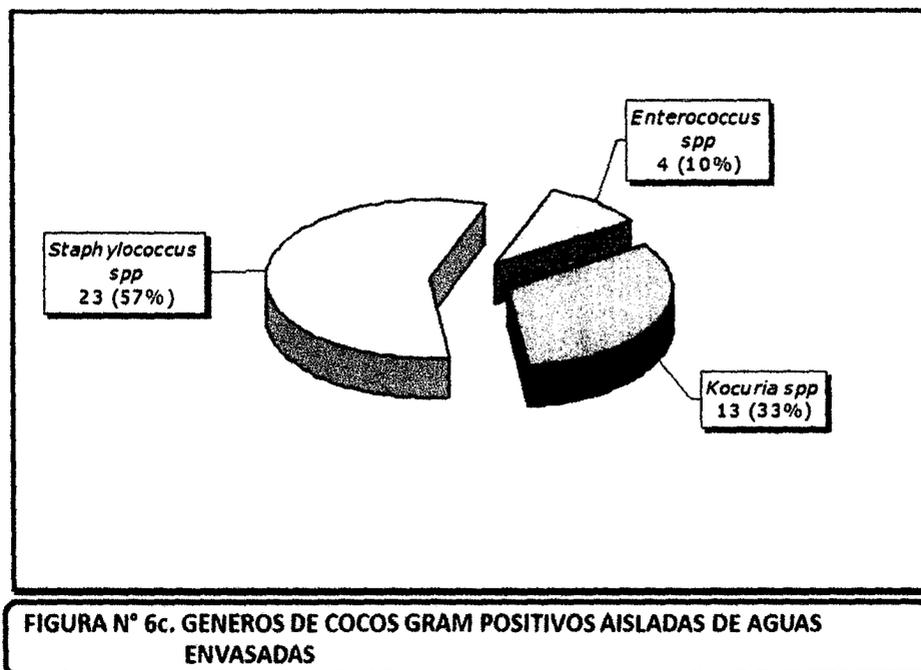
De las 214 colonias bacterianas aisladas e identificadas 97 (45,32 %) correspondieron a bacilos Gram negativos fermentadores, 77 (35,98 %) a bacilos Gram negativos no fermentadores y 40 (18,70 %) a cocos Gram positivos (Tabla 6).

TABLA N° 6. GÉNEROS DE BACTERIAS AISLADAS (N° Y % DE CEPAS)		
GÉNEROS	NÚMERO DE CEPAS	PORCENTAJE DEL TOTAL (%)
GRAM NEGATIVOS BACILOS FERMENTADORES	97	45,32
<i>Aeromonas</i>	12	5,61
<i>Cedecea</i>	2	0,93
<i>Citrobacter</i>	7	3,28
<i>Edwarsiella</i>	5	2,34
<i>Enterobacter</i>	16	7,48
<i>Escherichia</i>	17	7,94
<i>Hafnia</i>	6	2,8
<i>Klebsiella</i>	7	3,28
<i>Kluyvera</i>	2	0,93
<i>Leminorella</i>	1	0,47
<i>Plesiomonas</i>	2	0,93
<i>Proteus</i>	5	2,34
<i>Rahnella</i>	7	3,28
<i>Serratia</i>	8	3,77
GRAM NEGATIVOS BACILOS NO FERMENTADORAS	77	35,98
<i>Acinetobacter</i>	3	1,4
<i>Burkholderia</i>	9	4,21
<i>Chryseobacterium</i>	3	1,4
<i>Pseudomonas</i>	53	24,77
<i>Rafstonia</i>	3	1,4
<i>Shewanella</i>	4	1,87
<i>Weeksella</i>	2	0,93
GRAM POSITIVOS COCOS	40	18,7
<i>Enterococcus</i>	4	1,87
<i>Kocuria</i>	12	5,61
<i>Staphylococcus</i>	24	11,21
TOTAL	214	100

Al observar los datos recogidos en la tabla 6, se puede señalar que se logró identificar un total de 24 géneros bacterianos, correspondiendo 14 (58,33 %) a bacilos Gram negativos fermentadores, 7 (29,20 %) a bacilos Gram negativos no fermentadores y 3 (12,50 %) a cocos Gram positivos (Figura 6, 6a, 6b y 6c).







Seguidamente a la identificación de las cepas aisladas a nivel de género, se realizó la identificación a nivel de especies de las distintas colonias obtenidas, los resultados de estas determinaciones se muestran en la tabla 7.

Al analizar la tabla 7 podemos indicar que las 214 colonias aisladas se pudieron identificar e incluir en 46 especies, siendo las especies de mayor frecuencia de aislamiento *Pseudomonas aeruginosa* (19,16 %), *Escherichia coli* (6,54 %), *Kocuria rosea* (6,10 %), *Staphylococcus aureus* (4,67 %), *Aeromonas hydrophila* (3,74 %) y *Rhanella aquatilis* (3,27 %).

Es conocido que en la purificación de cepas bacterias de origen ambiental, muchas de las cepas que se aíslan en un principio, posteriormente no pueden ser identificadas por las pruebas contenidas en las galerías API, las cuales han sido diseñadas para la identificación de aislados clínicos, En este sentido, se empleó una técnica independiente del cultivo, basado en métodos de biología molecular para identificar dos colonias que se aislaron y se pudieron clasificar como Gram negativas pero no se pudieron identificar por el método clásico de identificación bacteriana.

TABLA N° 7. ESPECIES DE BACTERIAS HETEROTROFAS AEROBIAS MESOFILAS AISLADAS DE AGUA ENVASADA

GÉNEROS Y ESPECIES	NÚMERO DE CEPAS	PORCENTAJE DEL TOTAL (%)
GRAM NEGATIVOS BACILOS FERMENTADORES	97	45,32
<i>Aeromonas hydrophila</i>	8	3,74
<i>Aeromonas salmonicida</i>	4	1,87
<i>Cedecea spp.</i>	2	0,93
<i>Citrobacter freundii</i>	5	2,34
<i>Citrobacter braakii</i>	2	0,93
<i>Edwardsiella tarda</i>	5	2,34
<i>Enterobacter aerogenes</i>	2	0,93
<i>Enterobacter agglomerans</i>	3	1,4
<i>Enterobacter amnigenus</i>	2	0,93
<i>Enterobacter cloacae</i>	6	2,8
<i>Enterobacter gergoviae</i>	1	0,47
<i>Enterobacter sakazakii</i>	2	0,93
<i>Escherichia coli</i>	14	6,54
<i>Escherichia fergusonii</i>	3	1,4
<i>Hafnia alvei</i>	6	2,8
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5	2,34
<i>Klebsiella omithindytica</i>	2	0,93
<i>Kluyvera spp</i>	2	0,93
<i>Leminorella spp</i>	1	0,47
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	2	0,93
<i>Proteus mirabilis</i>	2	0,93
<i>Proteus spp</i>	3	1,4
<i>Rahnella aquatilis</i>	7	3,27
<i>Serratia marcescens</i>	2	0,93
<i>Serratia liquefaciens</i>	3	1,4
<i>Serratia odorifera</i>	3	1,4
GRAM NEGATIVOS BACILOS NO FERMENTADORAS	77	35,98
<i>Acinetobacter baumann</i>	3	1,4
<i>Burkholderia gladii</i>	4	1,87
<i>Burkholderia ralstonia</i>	5	2,34
<i>Chryseobacterium indologenes</i>	3	1,4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	41	19,16
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	5	2,34
<i>Pseudomonas luteola</i>	2	0,93
<i>Pseudomonas psudoalcaligenes</i>	4	1,87
<i>Pseudomonas putida</i>	1	0,47
<i>Ralstonia piketti</i>	3	1,4
<i>Shewanella putrefaciens</i>	4	1,87
<i>Weeksella virosa</i>	2	0,93
GRAM POSITIVOS COCOS	40	18,7
<i>Enterococcus faecalis</i>	4	1,87
<i>Kocuria rosea</i>	13	6,1
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	4,67
<i>Staphylococcus lentus</i>	2	0,93
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	4	1,87
<i>Staphylococcus sciuri</i>	2	0,93
<i>Staphylococcus spp</i>	4	1,87
<i>Staphylococcus xylosum</i>	1	0,47
TOTAL	214	100

Los resultados de estas determinaciones se resumen en la tabla 8. Al ver los resultados de la tabla 8 se puede indicar que las dos cepas en cuestion correspondieron a la especie *Enterobacter cloacae*, identificándose con un porcentaje de identificación del 89 %.

TABLA N° 8. RESULTADOS DE LA IDENTIFICACION MOLECULAR DE CEPAS BACTERIANAS AISLADAS DE MUESTRAS DE AGUAS ENVASADAS

CEPA	LONGITUD DEL AMPLIFICADO	ESPECIES MAS CERCANAS FILOGENETICAMENTE		
		ESPECIE (CEPAS)	N° DE ACCESO	PORCENTAJE DE IDENTIFICACION
J1	1000	<i>Enterobacter cloacae subsp. cloacae</i>	CP003737.1	89
J2	1000	<i>Enterobacter cloacae</i>	JQ512968.1	88

Finalmente a las principales cepas bacterianas aisladas se les determino los perfiles de resistencia a varios antimicrobianos. Los resultados de estos análisis se resumen en las tablas 9, 10 y 11.

TABLA N° 9. PERFILES DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA DE ESPECIES DE BACILOS GRAM NEGATIVOS NO FERMENTADORES AISLADOS DE AGUA ENVASADA

	Numero de aislados	Tetraciclinas/Sulfametoxazol (SXT)	Ciprofloxacina (CIP)	Cefotaxima (CTX)	Amoxicilina/ácido clavulánico (AMC)	Imipenem (IMI)	Meropenem (MER)	Ciprofloxacina (CIP)	Cefecidima (CAZ)	Ofloxacina/tazobactam (PTZ)	Acido Nalidixico (NAL)	Amikacina (AMK)	Gentamicina (GM)	Cloerfantocil	Neofloxacina (NOR)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	3			S		R	R	R		S					
<i>Burkholderia gladii</i>	4								R		R		R		
<i>Burkholderia rostonia</i>	3						S		S		S	R	R		
<i>Burkholderia rostonia</i>	2						S		S		R	S	S		
<i>Chryseobacterium indologenes</i>	3			R			R							R	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8					R	S	R	S	S					
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6					R	S	S	R	R					
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16					R	R								
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9					S	S								
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2					R	S								
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	6	S	S	R	R										
<i>Pseudomonas luteola</i>	2	R	R	R	S										
<i>Pseudomonas putida</i>	1	R	S	R	S										
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	4	S	S	S	S										
<i>Shewanella putrefaciens</i>	4					S	S	S	S	S					
<i>Ralstonia pikei</i>	3					S	S	R	R				R		
<i>Weeksella virosa</i>	2	R				S	S	S			R				S

TABLA N° 10. PERFILES DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA DE ESPECIES DE BACILOS GRAM NEGATIVOS FERMENTADORES AISLADOS DE AGUA ENVASADA

	Numero de aislados	Amoxicilina/Clavulánico (AMC)	Ceftazidime (CAZ)	Cefotaxime (CTX)	Imipenem (IMP)	Meropenem (MER)	Azteconam (ATM)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	6	R	S	S	R	R	R
<i>Aeromonas hydrophila</i>	2	R	S	S	S	S	S
<i>Aeromonas salmonicida</i>	4	R	S	S	S	S	S
<i>Cedecea spp</i>	2	R	R	R	R	R	S
<i>Citrobacter braakii</i>	2	R	R	R	S	S	R
<i>Citrobacter freundii</i>	5	S	S	S	R	R	R
<i>Edwardsiella tarda</i>	5	S	S	R	R	R	S
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	R	R	R	R	S	R
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	R	R	S	S	S	S
<i>Enterobacter agglomerans</i>	3	S	S	S	S	S	S
<i>Enterobacter amnigenus</i>	2	R	S	S	S	S	S
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	R	S	S	S	S	R
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	S	S	S	R	S	R
<i>Enterobacter cloacae</i>	4	R	R	S	S	S	R
<i>Enterobacter gergoviae</i>	1	R	R	R	S	S	S
<i>Enterobacter sakazakii</i>	2	R	R	S	S	S	R
<i>Escherichia coli</i>	6	S	S	S	R	R	S
<i>Escherichia coli</i>	1	S	R	R	S	S	R
<i>Escherichia coli</i>	3	S	S	S	S	S	R
<i>Escherichia coli</i>	4	R	S	R	R	R	S
<i>Escherichia fergusonii</i>	3	S	S	S	S	S	S
<i>Hafnia alvei</i>	6	R	R	S	R	S	R
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	S	R	S	S	S	S
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3	R	R	R	S	S	R
<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	2	S	S	S	S	R	R
<i>Kluyvera spp</i>	2	S	S	S	S	S	R
<i>Leminorella spp.</i>	1	S	S	S	S	S	S
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	2	R	R	R	S	S	R
<i>Proteus spp</i>	3	S	R	R	S	R	R
<i>Proteus mirabilis</i>	2	S	S	S	R	R	R
<i>Rahnella aquatilis</i>	7	S	S	R	R	R	R
<i>Serratia marcescens</i>	2	S	S	S	R	R	S
<i>Serratia liquefaciens</i>	3	S	S	S	S	R	R
<i>Serratia odorifera</i>	3	S	S	S	S	R	R

97

TABLA N° 11. PERFILES DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA DE ESPECIES DE COCOS GRAM POSITIVOS AISLADOS DE AGUA ENVASADA

	Numero de aislados	Cefoxitin (FOX)	Oxacilina (OXA)	Clindamicina (DA)	Eritromicina (E)	Tigerciclina (TYG)	Linezolid (LZ)
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	S	S	S	S	S	S
<i>Staphylococcus sciuri</i>	2	S	S	S	S	S	S
<i>Staphylococcus xylosus</i>	1	S	S	S	S	S	S
<i>Staphylococcus lentus</i>	2	S	S	S	S	S	S
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	4	S	S	S	S	S	S
<i>Staphylococcus spp (SCN)</i>	4	S	S	S	S	S	S
	23						

	Numero de aislados	Ampicilina (AMP)	Ampicilina/ Sulbactam (SAM)	Vancomicina (VAN)	Gentamicina (GM)
<i>Enterococcus faecalis</i>	4	R	S	S	S
	4				

	Numero de aislados	Cefoxitin (FOX)	Oxacilina (OXA)	Clindamicina (DA)	Eritromicina (E)	Tigerciclina (TYG)	Linezolid (LZ)
<i>Kocuria rosea</i>	13	S	S	S	R	S	R
	13						

Los resultados obtenidos para los perfiles de resistencia antimicrobiana de las principales especies de bacilos Gram negativos no fermentadores analizados, se muestran en la tabla 9.

Al observar los resultados de la tabla 9, se puede indicar que 17 cepas bacterianas fueron sensibles a los antimicrobianos ensayados, 7 fueron resistentes a un antibiótico, 32 resistentes a dos antibióticos y 21 cepas bacterianas fueron resistentes a mas de de dos antibióticos, considerándose en este ultimo caso como bacterias multiresistentes, las cuales representaron 68,8 % del total de bacterias Gram negativas no fermentadoras estudiadas.

Los perfiles de multiresistencia se observaron en las cepas de las especies *Burkholderia gladioli* (resistentes a meropenem, ceftazidime, ácido nalidixico, amikacina y gentamicina), *Acinetobacter baumann* (resistentes a imipenem, meropenem y ciprofloxacina), *Chryseobacterium indologenes* (resistentes a cefotaxime, meropenem y cloranfenicol), *Pseudomonas aeruginosa* (resistentes a imipenem, ceftazidime y piperacilina/tazobactama), *Pseudomonas luteola* (resistentes a trimetoprim/sulfametoxazol, ciprofloxacina y cefotaxime) y *Ralstonia piketti* (resistentes a ceftazidime, piperacilina/tazobactama y gentamicina) (Tabla9).

En el caso de la determinación de los perfiles de resistencia antimicrobiana para los bacilos Gram negativos fermentadores, los resultados se indican en la tabla 10. Al observar dichos resultados se puede señalar que 7 cepas bacterianas resultaron sensibles a todos los antibióticos ensayados, 15 cepas fueron resistentes a un antibiótico, 19 cepas a dos antibióticos y 56 cepas bacterianas resultaron resistentes a más de dos antibióticos, considerándose en este último caso como cepas bacterianas multiresistentes y que representó el 77,3 % de los aislados analizados.

En los perfiles de resistencias antimicrobiana de los bacilos Gram negativos fermentadores, se observaron multiresistencias en las cepas de las especies *Cedecea spp.* (resistentes a amoxicilina/ácido clavulánico, imipenem, meropenem, ceftazidime y cefotaxime), *Aeromonas hydrophila* (resistentes a amoxicilina/ácido clavulánico, imipenem, meropenem y aztreonam), *Citrobacter braakii* (resistentes a amoxicilina/ácido clavulánico, cefotaxime, ceftazidime y aztreonam), *Enterobacter aerogenes* (resistentes a amoxicilina/ácido clavulánico, imipenem, ceftazidime y cefotaxime), *Escherichia coli* (resistentes a amoxicilina/ácido clavulánico, cefotaxime, imipenem y meropenem), *Hafnia alvei* (resistentes a ceftazidime, amoxicilina/ácido clavulánico, imipenem y aztreonam), *Klebsiella pneumoniae* (resistentes a amoxicilina/ácido clavulánico, cefotaxime, ceftazidime y aztreonam), *Proteus spp.* (resistentes a meropenem, cefotaxime, ceftazidime y aztreonam), *Rahnella aquatilis* (resistentes a cefotaxime, imipenem, meropenem y aztreonam), *Citrobacter freundii* (resistentes a imipenem, meropenem y aztreonam), *Edwardsiella tarda* (resistentes a cefotaxime, imipenem y meropenem), *Enterobacter cloacae*

(resistentes a amoxicilina/acido clavulánico, ceftazidime y aztreonam), *Enterobacter gergoviae* (resistentes a amoxicilina/acido clavulánico, ceftazidime y cefotaxime), *Enterobacter sakazakii* (resistentes a amoxicilina/acido clavulánico, ceftazidime y aztreonam) y *Proteus mirabilis* (resistentes a aztreonam, imipenem y meropenem) (Tabla 10).

Para los cocos Gram positivos, los resultados de los perfiles de resistencias antimicrobianas se resumen en la tabla 11. En este caso los resultados indican que 23 cepas bacterianas de cocos positivos resultaron sensibles a todos los antibióticos evaluados, 4 cepas fueron resistentes a un antibiótico y 13 cepas bacterianas resultaron resistentes a dos de los antibióticos ensayados y que representaron el 32,5 % del total de las cepas analizadas.

Es importante resaltar que todas las cepas de *Staphylococcus* analizadas resultaron sensibles a los 6 antibióticos valorados. Las cepas de *Enterococcus faecalis* mostraron resistencia al antibiótico ampicilina y las cepas de *Kocuria rosea* evidenciaron ser resistentes a los antibióticos eritromicina y linezolid (Tabla 11).

6. DISCUSIÓN

La Agencia de Protección al Ambiente de Norteamérica (USEPA) reconoce la importancia de evaluar los niveles de bacterias heterótrofas aerobias mesófilas en el agua (USEPA, 1986). Su importancia radica en que muchas de estas bacterias presentes en el agua mineral envasada, son patógenas oportunistas (aproximadamente un 30 %). Existe evidencia de que algunas infecciones nosocomiales pueden ser causadas por estos patógenos oportunistas y ser transmitidos por el agua envasada (Oie y col., 2008; Islam y col., 2011).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, en referencia a las bacterias heterótrofas aerobias mesófilas, señalan que las mismas estuvieron presentes en 100 (52,63 %) de las 190 muestras de agua mineral envasada analizadas, con valores promedios fluctuantes entre 11 y 1.016,5 UFC/100ml (Tabla 1), resultados que coinciden con los señalados por diversos autores, y ponen de manifiesto buenas prácticas de manufactura en el envasado del agua mineral, ya que se ha puntualizado que cuando existe un control sanitario adecuado, los contajes de bacterias heterótrofas mesófilas registran valores menores a 10.000 UFC/100 ml (Zamberlan y col., 2008; Oyedeji y col., 2010; Islam y col., 2011; Venturini y col., 2011).

En un trabajo realizado por Manaia y col. en el año 1990, en donde se estudiaron 15 marcas de agua mineral envasada provenientes de Portugal, Francia y Bélgica, se señalan valores de bacterias heterótrofas mesófilas entre 100 UFC/100 ml a 3.600.000 UFC/100 ml (Manaia y col., 1990), resultados con tres ordenes de magnitud por encima, de los obtenidos en el presente trabajo.

De igual forma, resultados muy superiores a los encontrados en nuestra investigación, son los señalados por Falcone-Días y Farache en el año 2013, en un estudio realizado para conocer la calidad bacteriológica de las diferentes marcas de aguas minerales envasadas que se comercializan en Brasil. Los citados investigadores indican que en el 50% de las muestras analizadas, los valores de bacterias aerobias heterótrofas fluctuaron entre 50.000 y 5.600.000

UFC/100 ml, lo cual, de acuerdo a los autores, apunta a alguna clase de problema en el saneamiento durante el envasado del agua.

Así mismo, son superiores a los hallazgos señalados en la presente investigación, los resultados obtenidos en el trabajo realizado por Gangil y col. (2012), donde se investigó la calidad bacteriológica de 20 marcas de aguas minerales envasada de alto consumo en la ciudad de Jaipur, India, encontrando que el 50% de las muestras analizadas presenta valores por encima de 50.000 UFC/100 ml.

En un estudio llevado a cabo en los Estados Unidos de Norteamérica por Richards y col. (1992), se reporta que de 69 marcas de agua mineral analizadas, 50 (72 %) resultaron con valores de bacterias heterótrofas mesófilas superiores a 100.000 UFC/100 ml. Estos resultados, al igual que los reportados en investigaciones realizadas en otras partes del mundo (Jeena y col., 2006; Venieri y col., 2006), son mucho mayores a los obtenidos en la presente investigación.

Se interpreta que cuando el resultado del número de bacterias heterótrofas mesófilas es superior a 20.000 UFC/100 ml, se ha desarrollado algún problema bacteriano durante el almacenamiento o distribución del agua. La Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos de Norteamérica recomienda que el límite máximo de bacterias heterótrofas mesófilas en el agua potable debe ser de 30.000 UFC/100 ml (NAS, 1977).

En lo que respecta a Venezuela, son escasos los estudios donde se discutan valores de bacterias heterótrofas mesófilas en muestras de agua mineral envasadas, ya que la norma sanitaria para la elaboración y control de este tipo de producto, no establece la determinación del número de bacterias heterótrofas mesófilas (COVENIN, 1993). Sin embargo, Andueza en el año 2000, señala valores de bacterias heterótrofas mesófilas entre 100 UFC/100 ml a 650.000.000 UFC/100 ml en un total de 11 lotes de aguas minerales envasadas estudiadas (Andueza, 2000), y en otro realizado por Silva y col., en el año 2004, se reportan valores de bacterias heterótrofas mesófilas en el agua mineral envasada entre 700 UFC/100 ml a 6.200.000 UFC/100 ml (Silva y col., 2004).

Es importante señalar que del total de marcas de aguas minerales envasadas examinadas, el 47,37 %, que corresponde a 18 marcas, no se logró detectar la presencia de ninguna bacteria heterótrofa aerobia mesófila, lo cual llama la atención, ya que se trata de un producto no estéril que de acuerdo a la normativa existente para este tipo de bebida, la misma no pueden ser tratada por ningún método fisicoquímico (COVENIN, 1993), de manera de no alterar su composición microbiológica y organoléptica. Por ello se cree que estas marcas envasan agua tratada y no agua de manantial, a pesar de que no lo indican en su etiqueta.

Los resultados obtenidos a nivel de los coliformes totales, otro de los grupos bacterianos estudiados en el agua mineral envasada, evidencian que estuvieron presentes en 99 (52,11%) de las 190 muestras de agua mineral envasadas analizadas, correspondientes a 20 de las 38 marcas estudiadas, con valores promedios del orden de 1200 UFC/100 ml (Tabla 2).

Los valores antes señalados son preocupantes, considerando que en más del 50% de las muestras analizadas se logró detectar la presencia de miembros del grupo de coliformes totales, lo cual representa un riesgo para la salud del público consumidor, ante la posibilidad de encontrar bacterias patógenas causantes de enfermedades gastrointestinales.

A pesar de que en la mayoría de las normativas existentes a nivel internacional existe tolerancia cero para la presencia de células pertenecientes al grupo de los coliformes, la presencia de coliformes totales en muestras de aguas minerales envasadas ha sido señalada por investigadores en diversas partes del mundo, evidenciando en todos los casos problemas graves de contaminación de la fuente o manantial de donde procede el agua, o en muchos casos, colonización de las plantas envasadoras por una mala higienización de las mismas (Warburton y col., 1986; Novoa, 1989; Andueza, 2000; Silva y col., 2005).

Oyedeeji y col., en el año 2010, en un estudio sobre la calidad del agua envasada en bolsas y comercializadas en la ciudad de Ibadan en Nigeria, señalan que el 100 % de las muestras de agua mineral envasadas en bolsas, contenían

coliformes totales, excediendo los parámetros exigidos por la mayoría de normas internacionales y por consiguiente representando un riesgo para la salud del público consumidor.

En un trabajo realizado en el sector de San Diego del Estado Carabobo, Venezuela, en el año 2004, los autores indican la presencia de coliformes en el 97 % de las muestras de agua envasada estudiadas (Silva y col., 2004). Estos resultados son mucho mayores a los encontrados en la presente investigación, pero señalan que existe un problema de contaminación con las aguas minerales envasadas en algunas regiones del país, dado a que la presencia de coliformes totales revela problemas de higiene en las etapas de envasados o manipulación del agua.

Warburton y col. en el año 1986, reportaron el aislamiento de miembros del grupo coliformes en 2 muestras de un total de 73 muestras de agua mineral procedente de las principales ciudades del Reino Unido, de igual forma, en Venezuela Novoa (1989) señaló que de un total de 26 marcas de agua mineral envasada expendidas en la ciudad de Caracas, el 19.2 % de las mismas, presentaron bacterias del grupo coliformes.

La presencia de coliformes totales en muestras de aguas minerales envasadas evidencia problemas graves de contaminación de la fuente o manantial de donde procede el agua, o en muchos casos, la colonización de las plantas envasadoras.

Además de los coliformes totales, también se investigó la presencia de miembros de los coliformes fecales, encontrándose que en 88 (46,32%) de las 190 muestras de agua mineral envasadas estudiadas, correspondientes a 20 de las 38 marcas de aguas valoradas, había presencia de este grupo bacteriano (Tabla 3).

La presencia de miembros del grupo de coliformes fecales en muestras de agua, ponen de manifiesto el contacto de las misma con material de origen fecal, lo cual desde ningún punto de vista, es aceptable para el uso humano.

Los resultados encontrados, en relación a la presencia de coliformes fecales, sugieren serios problemas de contaminación de las fuentes de aguas que surten a las distintas plantas envasadoras, muy probablemente por problemas en la protección de los acuíferos o problemas de infiltración con fuentes de aguas residuales cerca del perímetro de protección de los manantiales (Geldreich y col., 1975).

Herath y col., (2012) analizaron muestras de agua mineral envasada comercializadas en Sir Lanka y encontraron que un 30 % de las muestras evaluadas tenían coliformes fecales y que la causa de ello sería la mala calidad sanitaria del agua de los manantiales de donde se captó el agua para envasar. De la misma manera, Gangil y col., en un estudio sobre la calidad sanitaria del agua mineral envasada expendida en la ciudad de Jaipur, India, realizado en el año 2012, señalaron que el 45% de las aguas envasadas en bolsas exhiben un contenido moderado de coliformes fecales, excediendo los valores de las normativas nacionales y regionales existentes. Los resultados antes indicados son similares a los obtenidos en la presente investigación y pudieran estar también relacionados con las causas que los investigadores encontraron en los estudios realizados.

Al estudiar la presencia de bacterias del género *Pseudomonas*, otro de los grupos bacterianos investigados, se logró detectarlas en 82 (43,16%) de las 190 muestras analizadas, correspondiente a 20 de las 38 marcas de agua mineral estudiadas (Tabla 4).

Los resultados obtenidos, respecto a la presencia de *Pseudomonas aeruginosa*, son similares a los señalados por investigadores en diversas partes del mundo (Venieri y col., 2006; Oie y col., 2008; Venturini y col., 2011; Falcone-Días y col., 2012).

Rosenberg (1990) señaló la experiencia de un laboratorio en Alemania en donde en un período de 3 años (1985-1988) lograron aislar *Pseudomonas aeruginosa* en un 10 % de las muestras estudiadas. Similamente, Richards y col. en el año 1992

reportaron el aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa* en un 4 % de las muestras de agua mineral examinadas en un estudio llevado a cabo en Inglaterra.

Los datos sobre el aislamiento de células de *Pseudomonas aeruginosa* en muestras de agua mineral elaboradas en Venezuela, también son escasos. Novoa en el año 1989, en un estudio sobre la calidad sanitaria del agua envasada consumida en la ciudad de Caracas, reseñó el aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa* en 13 (50 %) de 26 marcas de agua examinadas, y en otro estudio realizado por Andueza en el año 2000, se indicó el aislamiento de células de *Pseudomonas aeruginosa* en 6 (54,54%) de 11 marcas de aguas estudiadas. Los resultados antes señalados son muy similares a los encontrados en nuestra investigación, y sugieren que persisten los problemas de higiene y colonización en la mayoría de las plantas envasadoras del agua mineral, por parte de *Pseudomonas aeruginosa*.

Pseudomonas es una bacteria Gram negativa, oligocarbontolerante y puede por lo tanto multiplicarse en el agua mineral con bajos niveles de nutrientes, después de cierta adaptación. La presencia de esta bacteria en el agua mineral no solamente manifiesta una contaminación inaceptable, sino que además puede jugar, bajo ciertas condiciones, un papel importante como patógeno para el público consumidor (Schmidt-Lorenz, 1976; Richards y col., 1992; Hunter, 1993; Naze y col., 2010).

Los valores descriptivos globales obtenidos del número de bacterias aeróbicas mesófilas, coliformes totales, coliformes fecales y *Pseudomonas aeruginosa* en el agua mineral envasada analizada, señalan una alta variabilidad de los datos en relación a cada una de las marcas de aguas estudiadas (Tablas 1, 2, 3 y 4), lo cual es común en este tipo de agua, ya que en la composición y número de la microbiota influyen, de manera importante, sus características físico-químicas y la composición en sales (Chapelle, 2001; Leclerc y Da Costa, 2004).

Otro de los objetivos planteados en el trabajo, fue determinar cual era la composición taxonómica de los miembros de la población bacteriana heterótrofa

aerobia presente en el agua mineral envasada. Para ello en una primera instancia se clasificaron las distintas cepas aisladas y purificadas en base a su repuesta a la coloración de Gram. Los resultados obtenidos en cuanto a la clasificación global como bacterias Gram negativas y Gram positivas se indican en la tabla 5.

Al observar los resultados que se presentan en la tabla 5 podemos indicar que se lograron aislar un total de 268 colonias bacterianas, de las cuales se identificaron 214 colonias (79,90 %), correspondiendo 174 (64,93 %) cepas a bacterias Gram negativas, y 40 (14,93%) a bacterias Gram positivas, lo que nos indica un claro predominio de las bacterias Gram negativas.

Estos resultados están de acuerdo con lo que han señalado investigadores en diversas partes del mundo, en cuanto al prevalencia de las bacterias Gram negativas en este tipo de ecosistema acuático (Ducluzeau y col., 1976; Schwaller y Schmidt-Lorenz, 1980; Oger y col., 1987; Rosenberg, 1990; Hunter, 1993; De la Rosa y Mosso, 2000; Leclerc y Da Costa, 2004; Tampo, 2004; Casanova-Macsaea y Blanch, 2012).

Se ha señalado que la población de bacterias Gram negativas presentes en el agua mineral envasada, corresponden a bacterias heterótrofas oligotrofas y oligocarbofílicas, cuyos metabolismos se ha adaptado a este ambiente de bajo contenido de nutrientes (De la Rosa y Mosso, 2000; Leclerc y Da Costa, 2004).

Por otra parte, los resultados obtenidos confirman los hallazgo de investigadores en diversas partes del mundo en relación al predominio de bacterias Gram negativas en este tipo de agua y dejan en evidencian que la percepción que se tiene en relación a que el agua mineral envasada es un producto libre de bacterias, no es cierta.

La identificación de cepas bacterianas aisladas de muestras de aguas minerales, es difícil de realizar, ya que muchas cepas no logran sobrevivir en las resiembras realizadas en los medios de cultivos necesarios para su identificación. Por otro lado, se aíslan cepas cuyas características bioquímicas no coinciden con los

taxones descritos en la bibliografía (Reasoner y Geldreich, 1985; Ferreira y col., 1996; Ward, 1998; Leclerc y Da Costa, 2004) lo que imposibilita su identificación. Este tipo de resultado es frecuente en los estudios microbiológicos de aguas minerales naturales (Leclerc y Moreau, 2002). En el presente estudio no se han podido identificar un 20,15 % (54 colonias) del total de cepas aisladas similar a lo reportado por Mary y col. (2000).

Diversos investigadores han señalado que el 90 % de la población microbiana presente en el agua mineral, se encuentra en un estado fisiológico denominado viable no cultivable, dificultando de esta manera su cultivo, aislamiento e identificación por los métodos microbiológicos clásicos (De la Rosa y Mosso, 2000; Chapelle, 2001; Leclerc y Da Costa, 2004).

En relación a la composición de géneros de la microbiota presente en las aguas minerales envasadas, aspecto que prácticamente se desconoce en la mayoría de países del mundo, con la excepción de algunos países de Europa donde la cultura del agua mineral es muy importante desde el punto de vista económico, se tienen muy pocos trabajos de investigación, dado a que la mayoría se dirigen a comprobar la calidad sanitaria de esta agua de consumo masivo (Ducluzeau y col., 1976; Schmidt-Lorenz, 1976; Hunter, 1993; Leclerc y Da Costa, 2004; Venieri y col., 2006).

Pseudomonas aeruginosa ha sido la especie de bacteria Gram negativa no fermentadora, con mayor número de cepas aisladas (Tabla 7).

Algunas de las otras especies de *Pseudomonas* aisladas, como *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas luteola*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* y *Pseudomonas putida*, también han sido detectadas en aguas minerales envasadas (Bischofberger y col., 1990; Manaia y col., 1990; Mavridou y col., 1994; Elomari y col., 1995; Ferreira y col., 1996; Mary y col., 2000).

Los resultados del presente trabajo en relación con el género *Pseudomonas*, han resultado similares a lo señalado por diversos investigadores (Bischoffberg y col., 1990; Morais y Da Costa, 1990; Mavridou y col., 1994; Elomari y col., 1995; Jayasekara y col., 1998; Guyard y col., 1999; Andueza, 2000; Nascimento y col., 2000; Venieri y col., 2006; Oie y col., 2008; Nase y col., 2010; Vaz-Moreira y col., 2012; Vantarakis y col., 2013).

Una de las razones que se han postulado para explicar la presencia de especies del género *Pseudomonas* en las aguas minerales, esta relacionada con la gran versatilidad enzimática que presentan estas bacterias, lo cual les permite sobrevivir y proliferar en ambientes oligotróficos (Leclerc y Moreau, 2002).

El género *Pseudomonas* se encuentra muy distribuido en la naturaleza y su aislamiento de fuentes naturales, tales como, aguas minerales, aguas de manantiales y aguas minerales envasadas, ha sido señalado por diversos investigadores en varias regiones del mundo (Leclerc y Moreau, 2002; Ahmed y col., 2013; Vantarakis y col., 2013).

De acuerdo a lo señalado por Morais y Da Costa (1990) y Jayasekara y colaboradores (1998), *Pseudomonas* se encuentra en pequeña cantidad en agua mineral envasada almacenada, aunque en algunas aguas minerales puede constituir el principal componente de la población microbiana, sobre todo en los puntos de emergencia de los manantiales.

Entre las bacterias Gram negativas no fermentadoras aisladas destacan también las del género *Burkholderia*, la cual ha sido encontrada por diversos investigadores, en aguas minerales (Guillot y Leclerc, 1993; Jayasekara y col., 1998; Defive y col., 1999; Mary y col., 2000; Leclerc y Moreau, 2002; Messi y col., 2005). El género *Burkholderia*, tiene características semejantes a *Pseudomonas* y antes estaba incluido en este género (Yabuuchi y col., 1992; Estrada-De los Santos, 2013).

Las comunidades de bacterias Gram negativas no fermentadoras, identificadas en el presente trabajo, son similares a las encontradas por otros autores en aguas minerales en diferentes partes del mundo (Massa y col., 1995; Jayasekara y col., 1998; Defive y col., 1999; Mary y col., 2000).

La mayoría de las especies de bacterias Gram negativas no fermentadoras, que se han aislado en el presente trabajo, se han señalado como patógenos oportunistas en individuos inmuno suprimidos en los últimos años. Muchas de ellas se han asociado a diversas infecciones nosocomiales y se han aislado en los ambientes hospitalarios, tanto de muestras humanas, como de diversos ambientes y objetos de uso en esos centros (Magalhaes y col., 2003; Chihab y col., 2004; Mahenthrolingam y Vandamme, 2005).

En relación a las cepas de bacterias Gram negativas fermentadoras identificadas, destaca la presencia de las especies *Escherichia coli*, *Aeromonas hydrophila*, *Enterobacter cloacae* y *Rahnella aquatilis*.

Escherichia coli es el miembro más frecuente e importante del género *Escherichia* que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, son habitantes comunes en el tracto intestinal del hombre y los animales de sangre caliente, algunas cepas son consideradas patógenas entéricas debido al hecho de que cualquier cepa de la misma especie puede estar asociado a múltiples enfermedades (Mossel y col., 2003).

La presencia de esta bacteria en el agua o alimentos indica que puede haber existido contaminación fecal y que el consumidor podría estar expuesto a patógenos entéricos al ser ingeridos enfermedades (Mossel y col., 2003).

Este grupo de bacterias producen septicemias que provienen generalmente de infecciones del aparato urinario (cistitis, pielonefritis y prostatitis), extra abdominales (asociadas a perforación intestinal) y del tubo digestivo. Aunque las enfermedades más comunes son las gastroenteritis y la severidad de los cuadros depende del tipo de cepas implicada (Murray y col., 2009).

La presencia de *Escherichia coli* en el agua mineral envasada, a pesar de que las distintas regulaciones tienen tolerancia cero para esta bacteria, no es rara y concuerda con los resultados obtenidos en el presente trabajo. Autores en diversas regiones del planeta señalan el aislamiento de esta bacteria en este tipo de agua e indican que la contaminación de los acuíferos o manantiales de donde se capta el agua, como posible explicación de su presencia en este producto (Geldreich y col., 1975; Hunter, 1993; Venieri y col., 2006; Varga, 2011; Herath y col., 2012; Ahmed y col., 2013; Gangil y col., 2013; Momtaz y col., 2013).

Su presencia en el agua de bebida es inaceptable, y así lo establecen todos los reglamentos sanitarios relacionados con la calidad bacteriológica del agua de consumo, por lo que el aislamiento de esta bacteria en este tipo de producto de consumo masivo, conlleva un gran riesgo para la salud de la población de consumidores (NAS, 1977; OMS, 1985; USEPA, 1986; COVENIN, 1993; OMS, 2006; Carvajal y Oletta, 2012).

La especie *Aeromonas hydrophila* se ha aislado e identificados en algunas de las marcas de las aguas minerales envasadas analizadas en el presente trabajo. Varios autores han aislado esta bacteria del agua mineral ya que puede vivir con baja concentración de substratos (Quevedo-Sarmiento y col., 1986; Gonzalez y col., 1987; Manaia y col., 1990; Hunter, 1993; Jayasekara y col., 1998; Massa y col., 2001; Villari y col., 2003; Messi y col., 2005; Ahmed y col., 2013) .

Se considera a la especie *Aeromonas hydrophila* como patógeno oportunista pudiendo producir infecciones a través del agua, por lo que su presencia en el agua mineral envasada es un serio riesgo para la salud del público consumidor (Biscardi y col., 2002; Villari y col., 2003; Janda y Abbott, 2010).

En algunos países se han propuesto cambios en la legislación sobre la calidad microbiológica de las aguas minerales indicando que se incluya la investigación de este microorganismo por su poder patógeno (Warburton y col., 1998).

Otra de las especies aisladas e identificadas en las muestras de agua mineral envasada evaluadas, tanto por los métodos clásicos de identificación bacteriana como por los métodos moleculares, fue *Enterobacter cloacae*. El género *Enterobacter* a pesar de pertenecer a la familia de *Enterobacteriaceae* se considera que forma parte de la microbiota autóctona del agua ya que se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza (Quevedo-Sarmiento y col., 1986; Bishofberger y col., 1990), los resultados obtenidos en la presente investigación son similares a los señalados por diferentes autores quienes lo han aislado de aguas minerales envasadas en diferentes países (Schwaller y Schmidt-Lorenz, 1980; Quevedo-Sarmiento y col., 1986; González y col., 1987; Bischofberger y col., 1990; Organ, 1992; Schindler, 1994; Varnam y Sutherland, 1994; Ahmed y col., 2013; Vantarakis y col., 2013).

Diferentes especies de *Enterobacter* tienen un hábitat acuático y otros como *Enterobacter sakazakii*, al día de hoy integrante del nuevo género bacteriano *Cronobacter*, y *Enterobacter cloacae* son ubicuos habiéndose aislado del suelo, agua, alimentos y muestras humanas (Nazarowec y Farber, 1997; Sanders y Sanders, 1997; Isobe y col., 2001; Leclerc y Da Costa, 2004; Ivy y col., 2013).

A pesar de ser un habitante conspicuo de estos ecosistemas acuáticos, se ha señalado que pueden comportarse como patógenos oportunistas en la población de riesgo como niños, mujeres embarazadas, pacientes con terapias, inmuno suprimidos y personas ancianas, por lo que su presencia en un producto de consumo masivo como el agua envasada debe verse con mucho cuidado (Sanders y Sanders, 1997; Lupo y col., 2013).

Rahnella aquatilis es otra de las especies de bacterias Gram negativas fermentadoras, aisladas e identificadas en las muestras de agua envasada analizadas. Es una especie perteneciente al grupo de la *Enterobacteriaceae* y se ha indicado como patógeno oportunista, además se han aislados cepas resistentes y multiresistentes a diversos antibióticos. Su presencia en el agua mineral envasada ha sido señalada por diversos autores (Leclerc y col., 2001; Deak, 2010; Leclerc y Da Costa, 2011).

Otro de los grupos bacterianos aislados e identificados en el trabajo, ha sido el de los cocos Gram positivos. Destacando entre ellos las especies *Staphylococcus aureus* y *Kocuria roseus*.

Staphylococcus aureus es una bacteria Gram positiva perteneciente a la familia *Micrococcaceae*. El género *Staphylococcus* comprende actualmente 32 especies y quince sub especies; las especies de importancia médica son: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus saprophyticus*. Desde el punto de vista de la medicina, *Staphylococcus aureus* es la bacteria más importante de este género (Madigan y col., 2010).

Los *Staphylococcus* se encuentran muy difundidos en la naturaleza, en la piel del hombre y de varias especies animales. Se les encuentra en las superficies de los objetos, en el aire, el suelo, el agua, la leche, y lo más importante, *Staphylococcus aureus* puede colonizar la mucosa de las fosas nasales y faringe, y dar origen a un portador asintomático peligroso, ya que es la fuente de infección para otros tejidos y para otros individuos. Desde su nicho natural, pueden introducirse en el hombre por todas las formas conocidas: por vías respiratorias, por la ingestión de la bacteria o de sus toxinas preformadas, por excoiaciones de la piel y por las mucosas de los órganos genitales (Madigan y col., 2010).

La presencia de especies del género *Staphylococcus* en aguas minerales envasadas ya ha sido indicada por otros autores en diversas regiones del mundo (Gonzalez y col., 1987; Ogan, 1992; Hunter, 1993; Massa y col., 1995; Tsai y Yu, 1997; Venieri y col., 2006; Leclerc y Da Costa, 2011; Varga, 2011; Venturini y col., 2011; Casanova-Macsaea y Blanch, 2012; Falcone-Días y col., 2012).

Su presencia en el agua mineral envasada, nos indica contaminación por malas prácticas de higienes durante el proceso de envasado y manipulación de los envases, o por contaminación de equipos u operarios de los mismos (Leclerc y Moreau, 2002; Leclerc y Da Costa, 2004).

La otra especie de bacterias Gram positiva identificada fue *Kocuria roseus*. Las especies del género *Kocuria* pertenecen a la familia *Micrococcaceae*. Incluye 17 especies de las cuales la mayoría son aerobias estrictas. La identificación bioquímica del género y especies es difícil dada la heterogeneidad en la expresión de las pruebas bioquímicas (Silva, 2012).

Kocuria spp. es parte de la microbiota de la piel y orofaríngea y muchas de las especies se han aislado de muestras de origen ambiental y animal (suelos, agua marina, carnes, pollos). Con la introducción de nuevos sistemas de identificación automatizada ha empezado a ser reconocida, pudiendo antes haber sido informadas como *Micrococcus* spp. Los casos clínicos de infecciones comprobadas son escasos pero se han descrito en bacteriemias, sepsis asociada a catéter, endocarditis, colecistitis aguda, peritonitis y abscesos, en general en pacientes inmuno comprometidos (Silva, 2012).

Se ha señalado el aislamiento de cepas de *Kocuria* en diferentes muestras de agua, incluyendo las aguas minerales naturales y las envasadas (Hunter, 1993; Leclerc y Da Costa, 2004; Leclerc y Da Costa, 2011; Casanova-Macsaea y Blanch, 2012; Pindi y col., 2013).

De acuerdo a los resultados obtenidos podemos señalar que parte de la microbiota bacteriana identificada, pudiera considerarse como microbiota contaminante, la cual habría que considerar como compuesta por dos grupos, una transitoria y otra permanente (Schmidt-Lorenz, 1976). La transitoria consistiría, principalmente, en bacterias que no se multiplican en agua mineral y mueren o se convierten en no cultivables al cabo del tiempo, como *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter aerogenes* y *Enterococcus faecalis* (Leclerc y Da Costa, 2004). La permanente consiste en especies oligocarbotolerantes que pueden multiplicarse en sustratos con escasos nutrientes y permanecer viables durante mucho tiempo. Suelen ser bacterias Gram-negativas, psicrófilas y mesófilas como *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* (González y col., 1987; Leclerc y Moreau, 2002).

Por último, se estudió el perfil de resistencia antimicrobiana de la mayoría de las cepas de las especies bacterianas aisladas e identificadas, de manera de conocer la prevalencia de los genes de resistencias en las especies bacterianas presentes en el agua mineral envasada.

En lo que respecta a las bacterias Gram negativas no fermentadoras, destaca la presencia de cepas resistentes y multiresistentes a más de un antibiótico. En este sentido, cepas de las especies *Burkholderia gladii*, *Acinetobacter baumann*, *Chryseobacterium indologenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas luteola* y *Ralstonia piketti*, resultaron ser multiresistentes, representando un 68,8 % del total de las cepas de los bacilos Gram negativos no fermentadores evaluados.

Los antibióticos a los que fueron resistentes las especies antes mencionadas, fueron ácido nalidixico, amikacina, ceftazidima, cefotaxime, cloranfenicol, gentamicina, imipenem, meropenem, piperacilina/tazobactama y trimetoprim/sulfametoxazol.

Los resultados antes indicados son similares a los señalados por diversos autores en diferentes partes del mundo, y evidencian que existe una transferencia vertical de los factores genéticos asociados a la resistencia a los principales antimicrobianos de uso a nivel clínico humano en cepas de bacterias Gram negativas no fermentadoras (Rosenberg y col., 1989; Massa y col., 1995; Mary y col., 2000; Messi y col., 2005; Tirodismo y col., 2010; Ullah y col., 2012).

Rosenberg y col. en el año 1989, estudiaron 87 marcas de aguas minerales a la venta en Alemania, con el objeto de determinar la presencia de bacterias heterótrofas. Estas especies fueron resistentes a la mayoría de los antibióticos, entre los que se encontraban Cloranfenicol, Ampicilina, Gentamicina, ácido Nalidixico y Tetraciclina. Resultados muy parecidos a los obtenidos en el presente trabajo.

De igual forma, Massa y col. (1995) estudiaron ocho marcas de aguas minerales no carbonatadas en Italia, realizándole pruebas de susceptibilidad antimicrobiana a 11 especies del género *Pseudomonas spp.*, observando que todas ellas eran

resistentes a Ampicilina, Estreptomicina, Carbenicilina, Tetraciclina, Cotrimoxazol, Gentamicina y Cloranfenicol.

Por su parte, Mary y col. (2000), estudiaron cinco marcas de aguas minerales francesas, con el objeto de determinar bacterias heterótrofas con resistencia múltiple antimicrobiana (Amoxicilina, Aztreonam, ácido Nalidixico, Ciprofloxacina, Gentamicina, Amikacina y Piperacilina), encontrado diferentes cepas de *Comamonas testosteroni* tanto resistentes como multiresistentes.

En el año 2005, Messi y col. Aislaron 120 cepas provenientes de aguas minerales, con el objeto de determinar la actividad antimicrobiana y la resistencia a los antibióticos. Entre las especies aisladas e identificadas se encontraron predominantemente *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas aeruginosa* y con baja frecuencia de *Burkholderia cepacia*, observando que cerca del 80% de los aislados presentaron resistencia a los diferentes antibióticos evaluados, entre los que se encontraban Ampicilina, Gentamicina, Amikacina y ácido Nalidixico, y solo el 55% de las cepas aisladas resultaron ser multiresistentes. Estos resultados son muy similares a los que se obtuvieron de las especies Gram negativas no fermentadoras aisladas de aguas minerales envasadas de consumo en las principales ciudades de Venezuela

Finalmente, Ullah y col. (2012) señalan en un trabajo realizado en Pakistán la presencia de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* en aguas minerales resistentes a una gran diversidad de antibióticos con una alta prevalencia de cepas multiresistentes, resultados que están acorde con lo observado con las cepas de *Pseudomonas* aisladas en el presente trabajo

En referencia a los resultados obtenidos para las bacterias Gram negativas fermentadoras, en donde la prevalencia de la multiresistencia fue de 77,3 %, la mayor de las obtenidas entre los grupos bacterianos estudiados, se puede indicar que las principales especies bacterianas implicadas fueron las pertenecientes a las familia *Enterobacteriaceae*, destacando entre ellas las especies *Cedecea spp.*, *Citrobacter braakii* *Enterobacter aerogenes*, y *Escherichia coli*

Los resultados obtenidos en la presente investigación, respecto a la prevalencia en las bacterias Gram negativas fermentadoras de factores de resistencias a los antimicrobianos, son nuevamente muy similares a los que reseñan diversos investigadores en diferentes partes del mundo (Kailis y col., 1991; Vachee y col., 1997; Vaz-Moreira y col., 2012) lo que es de gran interés desde el punto de vista de la epidemiología y de la salud pública, puesto esta agua son de consumo generalizado dentro de la población.

Como se sabe, la resistencia bacteriana a los antimicrobianos es el resultado del uso indiscriminado de estas sustancias, que ejercen presión selectiva, promoviendo la supervivencia de bacterias mejor dotadas para su efecto letal, tanto en los ecosistemas terrestres como en los acuáticos

Las bacterias Gram negativas tienen un arsenal de mecanismos de resistencia a su disposición y la selección natural y la presión selectiva favorece el surgimiento de perfiles de multiresistencias entre ellas. Por otra parte, se debe considerar la presencia de elementos móviles de transferencia de genes dentro de las bacterias, lo que hace que la diseminación y transferencia horizontal y vertical de genes en la comunidad microbiana sea un fenómeno más frecuente que lo esperado.

Por ultimo, en el caso de los cocos Gram positivos, la mayoría de las cepas aisladas resultaron sensibles a los antibióticos evaluados, contrastando con lo obtenido en el caso de las bacterias Gram negativas. Estos hallazgos evidencian que las bacterias Gram positivas encontradas en estos ecosistemas poco tienen de conexión con los aislados humanos, donde el fenómeno de resistencia antimicrobiana esta mas extendido y que representan un serio problema para la salud publica.

Los resultados que se exponen en el trabajo deben llamar a la reflexión y a estar alerta, ya que las cepas bacterianas aisladas e identificadas de las muestras de agua mineral envasada, son en su mayoría resistentes a los principales grupos de antibióticos utilizados en la terapéutica de las principales infecciones bacterianas, como lo son los aminoglucósidos, betalactámicos, cefalosporinas, quinolonas y sulfonamida.

www.bdigital.ula.ve

7. CONCLUSIONES

Se logro detectar la presencia de bacterias heterótrofas aerobias mesófilas en 20 de las 38 marcas comerciales de agua estudiadas, aunque en un número bajo. En 100 de las 190 muestras de agua mineral envasadas valoradas, se logro cuantificar la cantidad de bacterias heterótrofas aerobias mesófilas en un rango entre 11 UFC/100 ml a > 2000 UFC/100 ml, con valores promedios entre 11 y 1016,5 UFC/100 ml.

Los coliformes totales estuvieron presentes en 20 de las 38 marcas de agua analizadas. En 99 (52,11%) de las 190 muestras de agua mineral envasadas analizadas, se pudo valorar la cantidad de coliformes totales, cuyos valores fluctuaron entre 3 UFC/100 ml a >2000 UFC/100 ml, con valores promedios entre 4,5 y 1008,5 UFC/100 ml.

De manera similar a lo encontrado con los coliformes totales, los coliformes fecales estuvieron presentes en 20 de las 38 marcas de aguas minerales envasadas investigadas. La cuantificación de los coliformes fecales en las 88 (46,32 %) muestras donde se logro detectar su presencia vario entre 2 UFC/100 ml a >2000 UFC/100 ml, con valores promedios entre 1,5 y 1004,5 UFC/100 ml.

La presencia de células de *Pseudomonas aeruginosa*, se puedo detectar en 20 de las 38 marcas comerciales de aguas analizadas. Se cuantifico el número de células de *Pseudomonas* en 82 (43,16%) muestras de las 190 analizadas, encontrando valores entre 1 a 31 UFC/100 ml, con valores promedios entre 2,5 y 21,5 UFC/100 ml.

Los valores descriptivos globales obtenidos del número de bacterias aeróbicas mesófilas, coliformes totales, coliformes fecales y *Pseudomonas aeruginosa* señalan una alta variabilidad en los valores obtenidos.

Se lograron aislar un total de 268 colonias bacterianas, lográndose identificar 214 (79,90 %) colonias, correspondiendo 174 (64,93%) cepas a bacterias Gram negativas, y 40 (14,93%) a bacterias Gram positivas. No se pudieron identificar 54 (20,15 %) colonias. De las 214 colonias bacterianas aisladas e identificadas 97 (45,32 %) correspondieron a bacilos Gram negativos fermentadores, 77 (35,98 %) a bacilos Gram negativos no fermentadores y 40 (18,70 %) a cocos Gram positivos.

A partir de las 214 colonias aisladas y purificadas se pudo identificar un total de 24 géneros bacterianos, correspondiendo 14 (58,33 %) a bacilos Gram negativos fermentadores, 7 (29,20 %) a bacilos Gram negativos no fermentadores y 3 (12,50 %) a cocos Gram positivos. De las 214 colonias aisladas se pudieron identificar e incluir en 46 especies, siendo las especies de mayor frecuencia de aislamiento *Pseudomonas aeruginosa* (19,16 %), *Escherichia coli* (6,54 %), *Kocuria rosea* (6,10 %), *Staphylococcus aureus* (4,67 %), *Aeromonas hydrophila* (3,74 %) y *Rhanella aquatilis* (3,27 %).

Los hallazgos obtenidos en relación a los perfiles de resistencia antimicrobiana de las cepas bacterianas presentes en el agua mineral envasada, muestran que este tipo de agua puede ser un reservorio importante de los genes de resistencia y multiresistencia a diversos antibióticos y que se deben aplicar medidas de vigilancia epidemiológicas tanto en los manantiales fuentes de esta agua, como en las plantas procesadoras de aguas envasadas

Llama la atención la presencia en este tipo de producto de un gran número de bacterias consideradas patógenas oportunistas con importantes perfiles de multiresistencia a los principales antibióticos de uso en la clínica, este hecho coloca en el tapete la controversia sobre la seguridad sanitaria de este tipo de agua, máxime cuando se trata de un producto cuya demanda ha ido creciendo paulatinamente en el país en los últimos años

Se pudo comprobar la hipótesis de trabajo evidenciando que la mayoría de las aguas minerales envasadas que se consumen en Venezuela poseen una microbiota bacteriana heterótrofa aerobia mesófila asociada, de la cual se puede deducir su calidad sanitaria, que en el caso del presente estudio pone de manifiesto la presencia de problemas de tipo higiénicos, con presencia de bacterias con potencial poder patógeno.

www.bdigital.ula.ve

8. BIBLIOGRAFIA

- **ADDO, K.; MENSAH, G.; DONKOR, B.; BONSU, C.; AKYEH, M. (2009).** Bacteriological quality of bottled water sold on the Ghanaian market. *Ajfund.* 9 (6):1378-1387.
- **AHMED. W.; YUSUF, R.; HASAN, I.; ASHRAF, W.; GOONETILLEKE, A.; TOZE, S.; GARDNER, T. (2013).** Fecal indicators and bacterial pathogens in bottled water from Dhaka, Bangladesh. *Brazilian Journal of Microbiology.* 44 (1): 97-103.
- **ALVAREZ, A. (2011).** *Susceptibilidad antimicrobiana a betalactámicos y detección de betalactamasas en bacterias gran negativas no fermentadoras aisladas del río Manzanares. Cumaná, estado Sucre.* Trabajo de grado. Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Cumaná.
- **ALBERT, A. (1999).** *Aplicaciones de la biotecnología en el mundo actual.* Vida Rural. 15 de Enero. Páginas 29-31. Madrid. España.
- **AL-QADIRI, H.; LU, X.; AL-ALAMI, N.; RASCO, B- (2011).** Survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Campylobacter jejuni* in Bottled Purified Drinking Water under Different Storage Conditions. *J. Food Prot.* 74(2):254-60.
- **ALLAN, J. (1995).** *Stream ecology. Structure and function of running waters.* Chapman and Hall, Edit. NY. USA.
- **ALLEN, M.; EDBERG, S.; REASONER, D. (2004).** Heterotrophic plate count bacteria what is their significance in drinking water. *Int. J. Food Microbiol.* 92: 265-274.
- **AMBROGGI, R. (2001).** Agua. *Investigación y Ciencia.* 24: 16-27.

- **AMERICAN PUBLIC HEALTH ASOCIATION (APHA). (2005).** *Standard methods for the examination of water and wastewater.* APHA. Edition 21. Washington. USA.
- **ANDREAZZI, M.; BARCELLOS, C.; HACON, S. (2007).** Old indicators for new problems: the relationship between sanitation and health. *Rev Panam Salud Publica.* 22(3):211–217.
- **ANDUEZA, F. (2000).** Calidad bacteriológica del agua mineral envasada expendida en la ciudad de Mérida, Venezuela: Estudio transversal Julio-Agosto 1998. *Rev. Fac. Farm. (Mérida).* 38: 9-19.
- **ANDUEZA, F. (2009).** El agua mineral envasada puede ser peligrosa. *Revista Investigación.* 19: 20-23.
- **AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). (2005).** *Standard methods for the examination of water and wastewater.* APHA. Edition 21. Washington. USA.
- **ARDA, B.; AYDEMIR, S.; YAMAZHAN, T.; HASSAN, A.; TUNGER, A.; SERTER, D. (2003).** *Comamonas testosteroni* meningitis in a patient with recurrent cholesteatoma. *APMIS.* 111: 474-476.
- **ARIAS, L.; ARMIJO, M.; SAN MARTÍN, J. (1995).** Concepto de termalidad y aguas minerales. *Bol. Soc. Esp. Hidro. Med.* 2: 93-100.
- **ARMIJO VALENZUELA, M. (2001).** Sanitary characteristics of bottled drinking water. *An. R. Acad. Nac. Med. (Madr).* 118: 459-474.
- **ARMIJO VALENZUELA, M.; SAN MARTIN, J. (1994).** *Curas balnearias y climáticas.* Editorial Complutense. Madrid. España.

- **ATLAS, R. y BARTHA, R. (2006).** *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. 2ª edición. Ed. Pearson educacion. Madrid. España.
- **BACH, C; DAUCHY, X.; CHAGNAN, M.; ELIENNE, S. (2012).** Chemical migration in drinking water stored in PPT. *Water Research*. 46 (3):571-583
- **BALKWILL, D.; BOONE, D. (1997).** *Identity and diversity of microorganisms cultured from subsurface environments*. In: PS Amy, and DL Haldeman (eds.) *The Microbiology of the Terrestrial Deep Subsurface*. CRC Press LLC, Boca Raton, FL., pp 105-117.
- **BARROW, G.I.; FELTHAM, R.K.A. (2004).** *Cowan and Steel's. Manual for the identification of medical bacteria*. Cambridge University Press. Third Edition. Cambridge.UK.
- **BARTRAM, J.; COTRUVO, J.; EXNER, M.; FRICKER, C.; GLASMACHER, A. (2004).** Heterotrophic plate count measurement in drinking water safety management. Report of an expert meeting Geneva, 24–25 April 2002. *Int. J. Food Microbiol.* 92: 241– 247.
- **BATISSON, I., CROUZET, O., BESSE-HOGGAN, P., SANCELME, M., MANGOT, J., MALLET, C., BOHATIER, J. (2009).** Isolation and characterization of mesotrione-degrading *Bacillus* spp. From soil. *Environmental pollution*. 157:1195-1201.
- **BIOMÉRIEUX. (1990).** *APILAB-Plus versión 3.3.3*.
- **BISCARDI, D.; CASTALDO, A.; GUALILLO, O.; DE FUSCO, R. (2002).** The occurrence of cytotoxic *Aeromonas hydrophila* strains in Italian mineral and thermal waters. *Sci. Total. Environ.* 292: 255-263.

- **BISCHOFBERGER, T.; CHA, S.; SCHMITT, R.; KONIG, R.; SCHMIDT-LORENZ, W. (1990).** The bacterial flora of non-carbonated, natural mineral water from the spring to reservoir and glass and plastic bottles. *Int. J. Food Microbiol.* 11: 51-72.
- **BIZIAGOS, E.; PASSAGOT, J.; CRANCE, J.; DELOINCE, R. (1988).** Long term survival of Hepatitis A virus and Poliovirus type 1 in mineral waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2705-2710.
- **BLAKE, P.; ROSENBERG, M.; FLORENCIA, J.; BANDEIRA, J.; DOPRADO, L.; GANGAROSA, E. (1977).** Cholera in Portugal, 1974. II. Transmission by bottled mineral water. *Am. J. Epidemiol.* 105: 344-348.
- **BOLETIN OFICIAL DE ESTADO (BOE). (1991).** *Real Decreto 1641/1991, de 22 de julio de 1991. Reglamentación Técnico-Sanitaria para la elaboración, circulación y comercio de aguas de bebida envasadas.* Boletín Oficial del Estado N° 178: 24818-24825. Madrid. España.
- **BOLETIN OFICIAL DE ESTADO (BOE). (2002).** *Real Decreto 1074/2002, de 18 de octubre, por el que se regula el proceso de elaboración, circulación y comercio de aguas de bebida envasadas.* Boletín Oficial del Estado N° 259: 37934-37949. Madrid. España.
- **BURTSCHER, M.; ZIBUSCHKA, F.; MACH, R.; LINDNER, G.; FARNLEITNER, A. (2009).** Heterotrophic plate count vs. *in situ* bacterial 16S rRNA gene amplicon profiles from drinking water reveal completely different communities with distinct spatial and temporal allocations in a distribution net. *Water SA.* 35 (4): 495-504.
- **CABRAL, D.; FERNÁNDEZ, P. (2002).** Fungal spoilage of bottled mineral water. *J. Food Microbiol.* 30: 73-76.

- **CAMPA, M.; BENDINELLI, M.; FRIEDMAN, H. (1993).** *Pseudomona aeruginosa as an opportunistic pathogen.* Ed. Plenum press. USA.
- **CARVAJAL, A.; OLETTA, F. (2012).** Agentes bacterianos asociados al agua de consumo humano. Red de Sociedades Científicas Médicas Venezolanas. *Noticias Epidemiológicas N ° 37.* Caracas Venezuela.
- **CASANOVAS-MASSANA, A.; BLANCH, A. (2012).** Diversity of the heterotrophic microbial populations for distinguishing natural mineral water. *International Journal Food Microbiology.* 153: 38-44.
- **CHAPELLE, F. (2001).** *Ground-water microbiology and geochemistry.* Ed. John Wiley and Sons. New York. USA.
- **CHAPELLE, F. (2005).** *Wellsprings: A Natural History of Bottled Spring Waters.* Piscataway: Rutgers University Press. USA.
- **CHARITY, R.; FOUKAS, A. (2005).** Osteomyelitis and secondary septic arthritis caused by *Sphingomonas paucimobilis.* *Infection.* 33: 93-95.
- **CHAURET, C.; VOLK, C.; CREASON, R.; JAROSH, J.; ROBINSON, J.; WARNES, C. (2001).** Detection of *Aeromonas Hydrophila* in drinking-water distribution system. *Can. J. Microbiol.* 47: 782-786.
- **CHI, C.; FUNG, C.; WONG, W.; LIU, C. (2004).** *Brevundimonas* bacteremia: two case reports and literature review. *Scand. J. Infect. Dis.* 36: 59-61.
- **CHIHAB, W.; ALAOUI, A.; AMAR, M. (2004).** *Chryseomonas luteola* identified as the source of serious infections in a Moroccan University Hospital. *J. Clin. Microbiol.* 42: 1837-1839.

- **CLAVELL, L.; PEDRIQUE DE AULACIO, M. (1992).** *Análisis microbiológicos de antibióticos.* (2ª Ed). Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela
- **CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (2005).** *Clinical and Laboratory Standard Institute Wayne, Pa. M100-S15, 25 (1).*
- **CODEX ALIMENTARIUS. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN. (CA-WHO-FAO). (1997).** *Norma Codex para las aguas minerales naturales. Codex STAN 108-1981.* Codex Alimentarius. Organización Mundial de la Salud. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma. Italia.
- **COELHO, D.; PIMENTEL, I.; BEUX, M. (1998).** Uso do metodo do sustrato cromogenico para quantificacao do numero de bacterias do grupo coniforme em aguas minerais envasadas. *Bol. Centro Pesqui. Process. Aliment.* 16: 45-54.
- **COMUNIDAD EUROPEA (CE). (1980).** Directiva 80/777/CE, del Consejo de 15 de julio 1980, relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros sobre explotación y comercialización de aguas minerales naturales. *Diario Oficial de la Comunidad Europea.* L 229: 47-56.
- **COMUNIDAD EUROPEA (CE). (1998).** Directiva 98/83/CE, de 3 de noviembre, relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano. *Diario Oficial de la Comunidad Europea L. 330: 32-54.*
- **COOPER, G.; STAPLES, E.; ICZKOWSKI, K.; CLANCY, J. (2005).** *Comamonas (Pseudomonas) testosteroni endocarditis. Cardiovasc. Pathol.* 14: 145-149.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial - Compartir Igual 3.0 Venezuela
(CC BY - NC - SA 3.0 VE)

- **COMITÉ VENEZOLANO DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN).** (1982). *Agua potable envasada*. Norma COVENIN No. 1431-82. Comité Venezolano de Normas Industriales (COVENIN). Caracas. Venezuela.
- **COMITÉ VENEZOLANO DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN).** (1986). *Agua. Método de membrana filtrante para análisis microbiológico*. 2409-86. Comité Venezolano de Normas Industriales (COVENIN). Caracas. Venezuela.
- **COMITÉ VENEZOLANO DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN).** (1993). *Norma venezolana de agua envasada para consumo humano*. Esquema 1. 1431 (R). Primera revisión. ICS 67.100.10 COVENIN 1431:93. Comité Venezolano de Normas Industriales (COVENIN). Caracas. Venezuela.
- **COSTA, J.; TIAGO, I.; DA COSTA, M.; VERÍSSIMO, A. (2005).** Presence and persistence of *Legionella spp.* in groundwater. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 663-67.
- **COWMAN, S.; KELSEY, R. (1992).** *Bottled water*. In C. Vanderzant & D. F. Splittstoesser (Eds.), *Compendium of methods for the microbiological examination of foods* (3rd ed.). American Public Health Association Washington, DC.
- **CRAUN, G. (1986).** *Waterborne diseases*. Ed. CRC Press. London. UK.
- **CRIADO, M.; FERNANDEZ PINTO, V.; BADESSARI, A.; CABRAL D. (2005).** Conditions that regulate the growth of moulds inoculated into bottled mineral water. *Int. J. Food Microbiol.* 99: 343-349.
- **DA CRUZ, J (2006).** *Agua embotellada: Signo de nuestro tiempo*. Observatorio de la globalización D3e. Numero 5. Mayo. Montevideo. Uruguay.
- **DASCHNER, F. (1998).** Is filtered or mineral water good for us and our patients. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 19: 889-90.

- **DEÁK, T. (2010).** Current taxonomy of common foodborne bacteria. *Acta Alimentaria*, 39 (4), 471-487.
- **DEFIVES, C.; GUYARD, S.; OULARE, .M.; MARY, P.; HORNEZ, J.P. (1999).** Total counts, culturable and viable, and non-culturable microflora of a French mineral water: A case study. *J. Appl. Microbiol.* 86:1033-1038.
- **DEGE, N. (2011).** *Technology of bottled water.* Third edition. John Wiley and Sons. UK.
- **DELABROISE, A. ; DUCLUZEAU, R. (1974).** Le microbisme naturel de l'eau minérale : son développement, son innocuité sur l'organisme. *Méd. nutri.* 2: 189-191.
- **DEKIO, I., HAYASHI, H., SAKAMOTO, M., KITAHARA, M., NISHIKAWA, T., SUEMATSU, M., BENNO, Y. (2005).** Detection of potentially novel bacterial components of the human skin microbiota using culture independent molecular profiling. *Journal of Medical Microbiology.* 54:1231-1238.
- **DE LA ROSA, C.; ANDUEZA, F.; SÁNCHEZ, M.; RODRÍGUEZ, M.; MOSSO, M. (2004).** Microbiología de las aguas mineromedicinales de los Bañerios de Jaraba. *Anal. Real Acad. Farm.* 70 (Extra.): 521-542.
- **DE LA ROSA, M.C. Y MOSSO, M.A. (2000).** *Diversidad microbiana de las aguas minerales termales.* En: Panorama actual de las aguas minerales y mineromedicinales en España, pp. 153-158. Ed. A.López y J.L. Pínuaga. ITGE. Madrid. España.
- **DE LA ROSA, M.; PINTADO, C.; RODRIGUEZ, C.; MOSSO, M.A. (2009).** Microbiología de los manantiales mineromedicinales de los Bañerios de Alicun de las Torres. *Anal. Real Acad. Farm.* 75: 763-780.

- **DE LA ROSA, M.C; SANCHEZ, C.; RODRIGUEZ, C.; MOSSO, M.A. (2007).** Microbiología del manantial mineromedicinales del Balnearios Puente viesgo. *Anal. Real Acad. Farm.* 73: 251-265.
- **DE ROY, K.; CLEMENT, L.; THAS, O.; WANG, Y.; BOON, N. (2012).** Flow cytometry for fast microbial community fingerprinting. *Water Research.* 46 (3): 907–919.
- **DEWETTINCK, T.; HULSBOSCH, W.; VAN HEGE, K.; TOP, E.; VERSTRAETE, W. (2001).** Molecular fingerprinting of bacterial populations in groundwater and bottled mineral water. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57: 412-418.
- **DOMÍNGUEZ-CARMONA, M. (2000).** El agua como vehículo de infección e infestación. *Anal. Real Acad. Farm.* 66: 355-396.
- **DORIA MF. (2006).** Bottled water versus tap water: understanding consumers-preferences. *J Water Health.* 4:271-276.
- **DUCLUZEAU, R. ; BOCHAND, J. ; DUFRESNE, S. (1976a).** La microflore autochtone de l'eau minérale: nature, caractères physiologiques, signification hygiénique. *Med. Nutr.* 2: 115-119.
- **DUCLUZEAU, R. (1976b).** La signification du nombre et de la nature des microorganismes telluriques presents dans l'eau minerale a l'emergence. *Ann. Ist. Super. Sanita.* 12:170-176.
- **ENVIRONMENT AGENCY (EA). (2006).** *The Microbiology of Drinking Water. Part 9 - Methods for the isolation an numeration of Salmonella and Shigella by selective enrichment membrane filtration and multiple tube-most probable number techniques.* Methods for the examination of waters and associate materials. Environment agency. Washington. USA.
- **EATON, W.; ROED, M.; CHASSOT, O.; BARRY, D. (2012).** Differences in soil moisture, nutrients and the microbial community between forests on the upper

Pacific and Caribbean slopes at Monteverde, Cordillera de Tilaran: implications for responses to climate change. *Tropical Ecology* 53(2): 235-240.

- **EDBERG, S.; ALLEN, M. (2004).** Virulence and risk from drinking water of heterotrophic plate count bacteria in human population groups. *Int. J. Food Microbiol.* 92: 255-263.

- **EDBERG, S.; KOPS, S.; KONTRICK, C.; ESCARZAGA, M. (1997).** Analysis of cytotoxicity and invasiveness of heterotrophic plate count bacteria (HPC) isolated from drinking water on blood media. *J. Appl. Microbiol.* 82: 455-461.

- **EGLI, T.; KOSTER, W.; MEILE, L. (2002).** Pathogenic microbes in water and food: changes and challenges. *FEMS. Microbiol. Rev.* 26: 111-112.

- **ECKMANNS, T.; OPPERT, M.; MARTIN, M.; AMOROSA, R.; ZUSCHNEID, I.; FREI, U.; RÜDEN, H.; WEIST, K. (2008).** An outbreak of hospital-acquired *Pseudomonas aeruginosa* infection caused by contaminated bottled water in intensive care units. *Clinical Microbiology and Infection.* 14. (5): 454-458.

- **ELOMARI, M.; COROLER, L.; IZARD, D.; LECLERC, H. (1995).** A numerical taxonomic study of fluorescent *Pseudomonas* strains isolated from natural mineral waters. *J. Appl. Bacteriol.* 78: 71-81.

- **ESQUERRE, G. (2008).** Análisis de los factores que explican la eficacia de la estrategia de denominación de origen como estrategia de marketing a través de un estudio de caso. La denominación de origen protegida queso Idiazábal en el País Vasco. Tesis doctoral. Universidad Nacional de Educación a distancia. Madrid. España.

- **ESTRADA-DE LOS SANTOS, P., VINUESA, P.; MARTÍNEZ-AGUILAR, L.; HIRSCH, A.; CABALLERO-MELLADO, J. (2013).** Phylogenetic Analysis of

Burkholderia Species by Multilocus Sequence Analysis. *Current microbiology*. 1:1-10.

- **EVANDRI, M.; TUCCI, P.; BOLLE, P. (2000).** Toxicological evaluation of commercial mineral water bottled in polyethylene terephthalate: A cytogenetic approach with *Allium cepa*. *Food Additives and Contaminants*. 17: 1037–1045.
- **FALCONE-DIAS, M.; VAZ-MOREIRA, I.; MANAIA, C. (2012).** Bottled mineral water as a potential source of antibiotic resistant bacteria. *Water Research*. 46 (11): 3612-3622.
- **FALCONE-DÍAS, M.; FARACHE, A. (2013).** Quantitative variations in heterotrophic plate count and the presence of microorganisms in bottled mineral water. *Food Control*. 31:90-95.
- **FERREIRA, A.; MORAIS, P.; GOMES, C.; DA COSTA, M. (1996).** Computer-aided comparison of protein electrophoretic patterns for grouping and identification of heterotrophic from mineral water. *J. Appl. Bacteriol*. 80: 479-486.
- **FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. (FDA). (2000).** *Code of Federal Regulations*. Title 21. Part 165. Sec. 165.1110: 501-515. Food and Drug Administration. Washington. USA.
- **FORBES, B. (2009).** *Bailey & Scott. Diagnóstico microbiológico*. Doceava edición. Editorial Panamericana. Buenos Aires. Argentina.
- **FOREIGN COMMERCIAL SERVICE. (2003).** *Sinopsis of the bottled water market. International market insight*. Foreign Commercial Service. USA. Washington. USA.
- **FOX, B. (1988).** Secrets of the source. *New Scientist*. 120: 45-48.

- **FRANCO, R.; CANTUSIO, R. (2002).** Occurrence of Cryptosporidial Oocysts and *Giardia* Cysts in Bottled Mineral Water Commercialized in the City of Campinas, State of São Paulo, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 97(2): 205-207.
- **FUJIKAWA, H.; AKETAGAWA, J.; NAKAZATO, M.; WAUKE, T.; TAMURA, H.; MOROZUMI, S.; ITOH, T. (1999).** Growth of moulds inoculated into commercial mineral water. *Letf. Appl. Microbiol.* 28: 211-215.
- **FUJIKAWA, H.; WANKE, T.; KUSUNOKI, J.; NOGUCHI, Y.; TAKAHASHI, Y.; OHTA, K.; ITOH, T. (1997).** Contamination of microbial foreign bodies in bottled mineral water in Tokyo, Japan. *J. Appl. Microbiol.* 82: 287-291.
- **GACETA OFICIAL DE LA REPUBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA (1998).** *Normas de calidad del agua potable.* Gaceta Oficial de la Republica Bolivariana de Venezuela No. 36.395. Caracas. Venezuela.
- **GANGIL, R.; TRIPARTHI, R.; PATGAL, A.; DUTTA, P. Y MATHUR, K. (2013).** Bacteriological evaluation of packaged bottled water sold at Jaipur city and its public health significance. *Vet. World.* Vol. 6 (1): 27-30
- **GARRITY, G.; BRENNER, D.; KRIEG, N.; STALEY, J. (2005).** *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* Second Ed. Vol. II. Springer. New York. USA.
- **GELDREICH, E.; NASH, H.; REASONER, D.; TAYLOR, R. (1975).** The necessity of controlling bacterial populations in potable waters, bottled waters and emergency waters supplied. *J. Am. W. Work Asso.* 67: 117-124.
- **GELDREICH, E.; TAYLOR, R.; BLANNON, J.; REASONER, D. (1985).** Bacterial colonization of point-of-use water treatment devices. *J. Am. W. Work Asso.* 77: 72-80.

- **GERHARDT, P.; MURRAY, R.; WOOD, W.; KRIEG; N. (1994).** *Methods for general and molecular bacteriology.* American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- **GHIORSE, W.; WILSON, J. (1988).** Microbial ecology of the terrestrial subsurface. *Adv. Appl. Microbiol.* 33: 107-172.
- **GIOVANNONI, S.; VERGIN, K. (2012).** Seasonality in Ocean Microbial Communities. *Science.* 335: 671-676.
- **GLEICK, P. (2011).** *Bottled and sold: History behind our obsession with bottled water.* Island Press. USA.
- **GOMESCACERES, L.; LOPEZ, R.; PETERSON, F.; MAZA, M. (2001).** *Evaluación de la calidad bacteriológica del agua envasada comercializada en la zona céntrica de Cartagena.* Tesis de Grado. Universidad de Cartagena. Cartagena. Colombia.
- **GONZALEZ, C.; GUTIERREZ, C., GRANDE, T. (1987).** Bacterial flora in bottled uncarbonated mineral water. *Can. J. Microbiol.* 33:1120-1125.
- **GRAY, N. (1994).** *Calidad del agua potable. Problemas y soluciones.* Ed. Acribia, Zaragoza. España.
- **GRAY, N. (2008).** *Drinking wáter quality: Problems and solutions.* Cambridge University Press. London, UK.
- **GRANT, M. (1998).** Analysis of bottled water for *Escherichia coli* and total coliforms. *J. Food. Prot.* 61:334-338.
- **GUILLOT, E.; LECLERC, H. (1993).** Biological specificity of bottled natural mineral waters: Characterization by ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns. *Journal of Applied Bacteriology.* 75: 292–298.

- **GUYARD, S.; MORY, P.; DEFIVES, C.; HORNEZ, J.P. (1999).** Enumeration and characterization of bacteria in mineral water by improved direct viable count method. *J. Appl. Microbiol.* 86: 841-850.
- **HALL, T. A. (1999).** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analisis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41:95-98.
- **HAMMES, F.; VITAL, M.; EGLI, T. (2010).** Critical Evaluation of the Volumetric "Bottle Effect" on Microbial Batch Growth. *Applied Environ. Microbiol.* Vol. 76 (4): 1278–1281.
- **HAVELAAR, A.; TOOROP-BOUMA, A.; MEDEMA, G. (1990).** The occurrence and significance of *Aeromonas* in water with special reference to natural mineral water. *Riv. Ital. Ig.* 50: 349-356.
- **HERATH, A.; ABAYASEKARA, C.; CHANDRAJITH, R.; ADIKARAM, N. (2012).** Temporal Variation of Microbiological and Chemical Quality of Noncrbonated Bottled Drinking Water Sold in Sri Lanka. *Journal of Food Science.* Vol. 77 (3): 160-164.
- **HERNANDEZ-DUQUINO; ROSENBERG, F. (1987).** Antibiotic resistant *Pseudomonas* in bottled drinking water. *Canadian Journal of Microbiology.* 33: 286-289.
- **HERRAIZ, N. (2006).** *Geopolitica del agua embotellada*. En: <http://www.fp-es.org/geopolitica-del-agua-embotellada>.
- **HILL, S. (2003).** *Ochrobactrum anthropi* bacteraemia. *Scand. J. Infect.* 35: 913.

- **HIRST, C. (1991).** Presence of enteric viruses in freshwater and their removal by the conventional drinking waters. *Riv. Ital. Ig.* 50: 394-400.
- **HOLT, J.G.; KRIEG, N.; SNEATH, D.; SLALEY, J.; WILLIAMS, S. (1994).** *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.* Williams & Wilkins. Baltimore.USA.
- **HU, Z.; WRIGHT, L.; MAHLER, R. (2011).** Bottled Water: United States Consumers and Their Perceptions of Water Quality. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* Vol. 8: 565-578.
- **HUNTER, P.; BURGE, S. (1987).** The bacteriological quality of bottled natural mineral waters. *Epidemiol. Infect.* 99: 439-443.
- **HUNTER, P. ; BURGE, S.; HORNBY, H. (1990).** An assessment of the microbiological safety of bottled mineral waters. *Riv. Ital. Ig.* 50: 394-400.
- **HUNTER, P. (1993).** The microbiology of bottled natural mineral waters. *J. Appl. Bacteriol.* 74: 345-352.
- **INSTITUTO URUGUAY XXI. (2011).** *Mercado de agua embotellada.* Mayo. Montevideo. Uruguay.
- **INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). (2000).** *Water quality – detection and enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria. Part 1: Membrane filtration method.* 9308-1:2000, International. Geneva.
- **INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). (2006).** *Water quality – detection and enumeration of Pseudomonas aeruginosa. Membrane filtration method.* 16266:2006, International. Geneva.

- **IRIARTE, M. (2009).** Calidad bacteriológica de las aguas embotelladas comercializadas en la Isla de Margarita (Venezuela) durante 2002-2008 *Ciencia*. 17 (3): 211-224.

- **ISLAM, S.; BEGUM, H.; Nili, N. (2011).** Bacteriological Safety Assessment of Municipal Tap Water and Quality of Bottle Water in Dhaka City: Health Hazard Analysis. *Bangladesh J. Med. Microbiol.* 4 (01): 9-13.

- **ISOBE, Y.; MATSUMOTO, Y.; YOKOIGAWA, K.; KAWAI, H. (2001).** Properties of an extracellular polysaccharide produced by a strain of *Enterobacter* isolated from pond water. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65: 1399-1401.

- **IVY, R.; FARBER, J.; PAGOTTO, F.; WIEDMANN, M. (2013).** International Life Science Institute North America *Cronobacter* (Formerly *Enterobacter sakazakii*) Isolate Set. *Journal of Food Protection.* 76 (1): 40-51.

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

- **JANDA, J.; ABBOTT, S. (2010).** The Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity, and Infection. *Clinical Microbiology Review.* 23 (1):35-73.

- **JAYASEKARA, N.; HEARD, G.; COX, J.; FLEET, G. (1998).** Population of pseudomonads and related bacteria associated with bottled non-carbonated mineral water. *Food Microbiol.* 15: 167-176.

- **JAYASEKARA, N.; HEARD, G.; COX, J.; FLEET, G. (1999).** Association of micro-organisms with the inner surfaces of bottles of non-carbonated mineral waters. *Food Microbiology.* 16: 115-128.

- **JEENA, M.; DEEPA, P.; MUJEEB RAHIMAN, K.; SHANTHI, R.; HATHA, A. (2006).** Risk assessment of heterotrophic bacteria from bottled drinking water

sold in Indian markets. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 209: 191–196.

- **JIMENEZ, S. (2000).** El agua: un recurso agotable. *Anal. Real Acad. Farm.* 66: 417- 432.
- **JOHNSON, M., ZARETSKAYA, I., RAYTSELIS, Y., MEREZHUK, Y., MCGINNIS, S., MADDEN, T. L. (2008).** NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Research*, 36:W5-W9.
- **JOURAVLEV A. (2004).** *Los servicios de agua potable y saneamiento en el umbral del siglo XXI.* CEPAL. Santiago de Chile. Chile.
- **KAILIS, E.; PAPANDREOUS, S.; PAPAPETROPUULOU, M. (1991).** Susceptibility pattern of *Pseudomonas* species isolated from bottled drinking water. *Microbial. Ecol. Heal. Dis.* 4: 243-244.
- **KAMRUZZAMAN, A.; NAZMUL, K.; NAHER, R.; NOOR, R. (2011).** Evaluation of Microbiological Quality of Commercially Available Bottled Water in the City of Dhaka, Bangladesh. *Stamford Journal of Microbiology.* 1 (1): 24-30.
- **KINGSOLVER, B. (2010).** El agua es vida. *National geographic.* 26 (4): 11-13.
- **KOCH, A. (2001).** Oligotrophs versus copiotrophs. *Bioessays.* 23: 657-661.
- **KOSER, S. AND SKINNER, W. (1992).** Viability of the Colon-Typhoid group in carbonated water and carbonated beverages. *Journal of Bacteriology.* 7: 111-121.
- **KREBS, C. J. (1994).** *Ecology. The Experimental Analysis of Distribution and Abundance.* 4th edition. New York: Harper Collins. 801 p.

- **KRIEG, R. AND HOLT, G. (1984).** *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. I. Williams & Wilkins. Baltimore.USA.
- **LAFUENTE, E. ; CATALAN, E. ; PACHECO, N. ; CATALAN, J. (2000).** *Tratado del agua : Control de la contaminación y depuración*. Edición Santa María. Mérida. Venezuela.
- **LAMOREAUX, P.; TANNER, J.; LAMOREAUX, P.; TANNER, J. (2001).** *Spring and bottled waters of the world : Ancient history, source, occurrence, quality and use*. Edit. Spring Verlag. USA.
- **LANE, D. J. (1991).** *16S/23S rRNA sequencing*. Pp. 115.148. In Stackebrandr, E., Goodfellow, M. (Eds): *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. John wiley & Sons, Inc. New York, USA.
- **LECLERC, H. (1976).** Criteria for the evaluation of hygienic and microbiologic characteristic of mineral waters. *Ann. Ist. Super. Sanita* 12: 210-217.
- **LECLER, H. (1994).** Les eaux minerals naturelles: flore bacterienne native, nature et signification. *Eaux. Minérales*. 94: 49-60.
- **LECLERC, H.; DA COSTA, M. (2004).** *Microbiology of natural mineral waters*. In: *Technology of Bottled water*. Second Edition. Edited bay Dorothy Senior and Nicholas Dege. Blacwell. Publishing.
- **LECLERC, H.; DA COSTA, M. (2011).** *Microbiology of Natural Mineral Waters*. In: *Technology of bottled water*, Editor Nicholas Dege Thritd Edition. John Wiley & Sons. NY. USA
- **LECLERC, H.; MOREAU, A. (2002).** Microbiological safety of natural mineral water. *FEMS. Microbiol. Rev.* 26: 207-222.

- **LECLERC, H. ; MORIAMEZ, J. (1980).** Etude quantitative de la flore fécale de l'adulte et du nourrisson alimenté artificiellement. *Path. Biol.* 28 : 217-226.
- **LECLERC, H.; MOSSEL, D.; SAVAGE, C. (1985).** Monitoring noncarbonated ('still') mineral waters for aerobic colonisation. *International Journal of Food Microbiology.* 2: 341–347.
- **LECLERC, H.; MOSSEL, D.; EDBERG, S.; STRUIJK, C. (2001).** Advances in the bacteriology of the coliform group: their suitability as markers of microbial water safety. *Annual Reviews in Microbiology,* 55(1), 201-234.
- **LEGNANI, P.; LEONI, E.; RAPUANO, S.; TURIN, D.; VALENTI, C. (1999).** Survival and growth of *Pseudomonas aeruginosa* in natural mineral water: A 5-year study. *International Journal of Food Microbiology.* 53: 153–158.
- **LEONI, E.; ZANETTI, F.; CRISTINO, S.; LEGNANI, P. (2005).** Monitoring and control of opportunistic bacteria in a spa water used for aerosol hydrotherapy. *Ann. Ig.* 17: 377-384.
- **LEVESQUE, B. ; GAUVEN, D. (1994).** Microbiologie des eaux embouteillées: un point de vue de santé publique. *Bul. Infor. San. Environ.* 5.
- **LIMÓN MONTERO, A. (1697).** *Espejo cristalino de las aguas de España.* Alcalá de Henares. Reproducción facsímil. Ed. Instituto Geológico y Minero de España. Madrid.
- **LÓPEZ, M., (2006).** *Crece mercado de agua embotellada.* En: <http://www.grupogalo.com/content/view/847/1/>.
- **LOY, A.; BEISKER, W.; MEIER, H. (2005).** Diversity of Bacteria Growing in Natural Mineral Water after Bottling. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 3624–3632.

- **LUPO, A.; COYNE, S.; ULRICH BERENDONK, T. (2013).** Origin and Evolution of Antibiotic Resistance: The Common Mechanisms of Emergence and Spread in Water Bodies. *Front Microbiol.* 3: 18.
- **LUTSENKO, A.; PALAHNIU, K. (2010).** *Water microbiology.* Nova science, Inc. USA.
- **LLAMAS, M. (1992).** *Caracterización hidrogeológica de las aguas minero-medicinales.* En: Jornadas de aguas minerales y minero-medicinales en España. Ed. Instituto Tecnológico Geominero de España. Madrid. España.
- **MACERATA, U.; LEVRE, E.; ARMANI, G.; AGOSTINI, G.; MOLINARI, G.; CAROLI, G. (1988).** Bacterial species detected in some bottled mineral waters sold in Italy. *Int. J. Clin. Pharmacol. Res.* 8: 31-37.
- **MACFADDIN, J. (2003).** *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica.* Tercera edición. Editorial médica panamericana. Buenos Aires. Argentina.
- **MADIGAN, M.; MARTINKO, J.; PARKER, J. (2010).** *Brock. Biología de los microorganismos.* Decima tercera edición. Pearson educación. Madrid. España.
- **MADSEN, E., GHIORSE, W. (1993).** *Groundwater microbiology: subsurface ecosystem processes.* In: Aquatic Microbiology: an Ecological Approach (Ford, T.E., Ed.), Blackwell Sciencs Publications, Boston. USA.
- **MAEGAN, M. (2012).** Bottled promise: Regulating bottled water consumption. *Journal of Politics and International Affairs.*IV (1): 33-46.
- **MAGALHAES, M.; DOHERTY, C.; GOVAN, J.; VANDAMME, P. (2003).** Polyclonal outbreak of *Burkholderia cepacia* complex bacteraemia in haemodialysis patients. *J. Hosp. Infect.* 54: 120-123.

- **MAHENTHIROLINGAM, E.; VANDAMNE, P. (2005).** Taxonomy and pathogenesis of the *Burkholderia cepacia* complex. *Chron. Respir. Dis.* 2: 2009-2017.
- **MAIER, R.; PEPPER, I.; GERBA, C. (2009).** *Environmental microbiology.* Academic press. USA.
- **MANAHAN, S. (2007).** *Introducción a la química ambiental.* Editorial Reverte. Barcelona. España.
- **MANAIA, C.; NUNES, O.; MORAIS, P.; DA COSTA, M. (1990).** Heterotrophic plate counts and the isolation of bacteria from mineral waters on selective and enrichment media. *J. Appl. Bacteriol.* 69: 871-876.
- **MARGALEF, R. (1983).** *Limnología.* Editorial Omega. Barcelona. España.
- **MARY, P.; DEFIVES, C.; HORNEZ, J. (2000).** Occurrence and multiple antibiotic resistance profiles of non-fermentative Gram-negative microflora in five brands of non-carbonated french bottled spring water. *Microb. Ecol.* 39: 322-329.
- **MASOUD, T.; MARTÍNEZ, M.; TORIJA, M.E. (1982).** Aguas minero-medicinales y de mesa. II Clasificación, composición y legislación. *Alimentaria:* 37-47.
- **MASSA, S.; ALTIERI, C.; D'ANGELA, A. (2001).** The occurrence of *Aeromonas* spp. in natural mineral waters and well water. *Int. J. Food Microbiol.* 63: 169-173.
- **MASSA, S.; PETRUCCIOLI, M.; FANELLI, M.; GORI, L. (1995).** Drug resistant bacteria in non carbonated mineral waters. *Microbiol. Res.* 150: 403-408.
- **MAVRIDOU, A. (1992).** Study of the bacterial flora of non-carbonated natural mineral water. *J. Appl. Bacteriol.* 73: 355-361.

- **MAVRIDOU, A.; PAPAPETROPOULOU, M.; BOUFA, P.; LAMBIRI, M.; PAPADASKI, J. (1994).** Microbiological quality of bottled water in Greece. *Letf. Appl. Microbiol.* 19: 213-216.
- **MEIER, H.; BEISKER, W. (1997).** Detection and identification of microbial populations in mineral water using DNA-stains, fluorexence in situ hybridization. *Deut. Gells. Xytom. (DGFZ).* Abstract test N°. 37.
- **MELGAREJO, L.; SANCHEZ, J.; CHAPARRO, A.; NEWMARK, F.; SANTOS-ACEVEDO, M.; BURBANO, C.; REYES, C. (2002).** *Aproximación al estado actual de la bioprospeccion en Colombia.* Cargraphics. Serie de Documentos Generales INVEMAR No.10. 334 Págs. Bogota Colombia.
- **MESSI, P.; GUERRIERI, E.; BONDI, M. (2005).** Antibiotic resistance and antibacterial activity in heterotrophic bacteria of mineral water origin. *Sci. Total Environ.* 346: 213-219.
- **MOMTAZ, H.; DEHKORDI, F.; RAHIMI, E.; ASGARIFAR, A. (2013).** Detection of *Escherichia coli*, *Salmonella* species, and *Vibrio cholerae* in tap water and bottled drinking water in Isfahan, Iran. *BMC Public Health.* 13: 556.
- **MORAIS, P.; DA COSTA, M. (1990).** Alterations in the major heterotrophic bacterial populations isolated from a still bottled mineral water. *J. Appl. Bacteriol.* 69: 750-757.
- **MORENO, C. (2001).** *Métodos para medir la Biodiversidad.* Editado por el Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo, la Oficina Regional de Ciencia y Tecnología para América Latina y El Caribe y la Sociedad Entomológica Aragonesa. Zaragoza, España.
- **MOSSEL, D.; MORENO, B.; STRUIJK, C. (2003).** *Microbiología de los alimentos.* Segunda edición. España: Editorial Acirbia, S.A.

- **MOSSO, M.A.; DE LA ROSA, M.C. (2011).** Microbiología de los manantiales mineromedicinal de los balnearios de Baños de la Concepción. *Anal. Real Acad. Nal. Farm.* 77: 57-73.
- **MOSSO, M.A.; DE LA ROSA, M.C.; VIVAR, C.; MEDINA, M.R. (1994).** Heterotrophic bacterial populations in the mineral waters termal springs in Spain. *J. Appl. Bacteriol.* 77: 370-381.
- **MOSSO, M.A.; SÁNCHEZ, M.; DE LA ROSA, M.C. (2002).** Microbiología del agua mineromedicinal de los balnearios de Alhama de Granada. *Anal. Real Acad. Nal. Farm.* 68: 381-405.
- **MURRAY, P.; ROSENTHAL, K.; PFALLER, M. (2009).** *Microbiología Médica.* 6ª edición. España. Elseiver Mosby.
- **NAGARKAR, P.; RAVETKAR, S.; WATVE, M.G. (2001).** Oligophilic bacteria as tools to monitor aseptic pharmaceutical production units. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1371-1374.
- **NASCIMENTO, A.; AZEBEDO, T.; MENDES, N.; IBÁÑEZ, M. (2000).** Qualidade microbiologicas das aguas minerais consumidas na cidade de Sao Luis. *Hig. Aliment.* 14: 69-72.
- **NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE (NAS). (1977).** *Drinking water and Health.* Vol 1. National Academy of Science (NAS). National Academy Press. Washington. USA.
- **NAZAROWEC-WHITE, M.; FARBER, J. M. (1997).** *Enterobacter sakazakii: a review. International Journal of food microbiology,* 34(2): 103-113.
- **NAZE, F.; JOUEN, E.; RANDRIAMHAZO, R.; SIMAC, C.; LAURENT, P.; BLÉRIOT, A.; CHIROLEU, F.; GAGNEVIN, L.; PRUVOST, O.; MICHAULT, A. (2010).** *Pseudomonas aeruginosa* Outbreak Linked to Mineral Water Bottles in a

Neonatal Intensive Care Unit: Fast Typing by Use of High-Resolution Melting Analysis of a Variable-Number Tandem-Repeat Locus. *J Clin Microbiol.* 48(9): 3146–3152.

- **NICOLETTI, G.; RUSSO, G. (1979).** Gram-negative microbial flora in natural mineral waters *Nuovi. Ann. Ig. Microbiol.* 30: 247-251.
- **NIEMI, R.M.; KNUTH, S.; LUNDSTRÖM, K. (1982).** Actinomycetes and Fungi in Surface Waters and in Potable Water. *Appl. Environ. Microbiol.* 43: 378-388.
- **NOVOA, M. (1989).** Calidad microbiológica de aguas minerales envasadas en Venezuela. *Bol. Soc. Venez. Microbiol.* 9: 17.
- **OGAN, M. (1992).** Microbiological quality of bottled water sold in retail outlets in Nigeria. *J. Appl. Bacteriol.* 73: 175-181.
- **OGER, C.; HERNANDEZ, J.; DELATTREE, J.; DELABROISE, A.; KRUPSKY, S. (1987).** Etude par epifluorescence de l'evolution de la microflore totale dans une eau minérale embouteillée. *W. Res.* 21: 469-474.
- **OIE, S.; MATSUZAKA, Y.; KIYONAGA, H.; MAEDA, K.; KAMIYA, A. (2008).** Microbiological safety of bottled mineral water in patients susceptible to infections. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi.* 49(4):308-10.
- **OJO, O.; BAKARE, S.; BABATUNDE, A. (2007).** Microbial and chemical analysis of potable water in public water supply within Lagos University, Ojo. *Afr. J. Infect. Dis.* 1(1): 30-35.
- **ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD (WHO). (1972).** *Normas Internacionales para el agua potable.* Organización Mundial de la Salud. Ginebra. Suiza.

- **ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD (WHO). (2006).** *Guía para la calidad del agua potable.* Primer apéndice a la tercera edición. Vol. 1. Organización Mundial de la Salud. Ginebra. Suiza.

- **ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN (WHO-FAO) (1985).** *Código internacional recomendado de prácticas de higiene para la captación, elaboración y comercialización de las aguas minerales naturales.* CAC/RCP 33: 1-16. Organización Mundial de la Salud. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma. Italia.

- **ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD (OPS) (1987).** *Guía para la calidad del agua potable.* Organización Panamericana de Salud. USA.

- **ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (1998).** *Análisis del sector de agua potable y saneamiento en Venezuela. Plan regional de de inversiones en ambiente y salud.* Organización Panamericana de Salud (OPS). Organización Mundial de Salud, WHO. Ginebra. Suiza.

- **OYEDEJI, O.; OLUTIOLA, P. AND MONINUOLA, M. (2010).** Microbiological quality of packaged drinking water brands marketed in Ibadan metropolis and Ile-Ife city in South Western Nigeria. *African Journal of Microbiology Research.* 4(1): 096-102.

- **PALOMARES, J.; POZUELO, M. (2004).** Análisis de la radioactividad en aguas de los Balnearios de Jaraba. *An. R. Acad. Nac. Farm.* 70: 513-520.

- **PAVIA, A. (1987).** Travel to the Soviet Union: Is diarrhea a risk? *J. Am. Med. Ass.* 258: 1661.

- **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. *Appl. Environ. Microbiol.*57: 945-948.

- **PEPPER, I.; RUSIN, P.; QUINTANAR, D.; HANEY, C.; JOSEPHSON, K.; GERBA, C. (2004).** Tracking the concentration of heterotrophic plate count bacteria from the source to the consumer's tap. *Int. J. Food Microbiol.* 92: 289-295.

- **PERLMUTTER D.; ROTHSTEIN, R. (2011).** *The Challenges of Climate Change: Which Way Now.* John Wiley & Sons. London. UK.

- **PETERSON, J.; GARGES, S.; GIOVANNI, M.; MCINNES, P.; WANG, L.; SCHLOSS, JA.; BONAZZI, V.; MCEWEN, JE.; WETTERSTRAND, KA.; DEAL, C.; BAKER, CC.; DI FRANCESCO, V.; HOWCROFT, TK.; KARP, RW.; LUNSFORD, RD.; WELLINGTON, CR.; BELACHEW, T.; WRIGHT, M.; GIBLIN, C.; DAVID, H.; MILLS, M.; SALOMON, R.; MULLINS, C.; AKOLKAR, B.; BEGG, L.; DAVIS, C.; GRANDISON, L.; HUMBLE, M.; KHALSA, J.; LITTLE, AR.; PEAVY, H.; PONTZER, C.; PORTNOY, M.; SAYRE, MH.; STARKE-REED, P.; ZAKHARI, S.; READ, J.; WATSON, B.; GUYER, M. (2009).** The NIH Human Microbiome Project. *Genome Res.* 19(12): 2317-23.

- **PINDI, P.; RAGHUVeer, P.; SHIVA SHANKER, A. (2013).** Identification of Opportunistic Pathogenic Bacteria in Drinking Water Samples of Different Rural Health Centers and Their Clinical Impacts on Humans. *BioMed Research International.* 1: 1-10

- **PIPES, W. (1982).** *Bacterial indicators of pollution.* CRC Press. Boca Raton. Florida. USA.

- **PITT, J.L.; HOCKING, A.D. (1997).** *Fungi and food spoilage.* Ed. Blackie Academic and Professional. London. UK.

- **PRUSS-USTUN, A.; BONJOUR, S.; CORVALÁN, C. (2008).** The impact of the environment on health by country: a meta-synthesis. *Environmental Health*. 7:7.
- **QUEIROZ, J.; ROSENBERG, M.; HELLER, L.; ZHOURI, A.; SILVA, S. (2012).** News about Tap and Bottled Water: Can This Influence People's Choices?. *Journal of Environmental Protection*. 3: 324-333.
- **QUEVEDO-SARMIENTO, J.; RAMOS-CORMENZANA, A.; GONZÁLEZ LÓPEZ, J. (1986).** Isolation and characterization of aerobic heterotrophic bacteria from natural spring waters in the Lanjarón (Spain). *J. Appl. Bacteriol.* 61: 365-372.
- **RAPPE, M.; GIOVANNONI, S. (2003).** The uncultured microbial majority. *Annu. Rev. Microbiol.* 57: 369-394.
- **REASONER, D.; GELDREICH, E. (1985).** A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 1-7.
- **RESENDE, A.; NUNES, C. (2008).** Perfil microbiológico da água mineral comercializada no distrito federal. *Rev. Saúde e Biol.* 3 (2): 16-22.
- **RICHARDS, J.; STOKELY, D.; HIPGRAVE, P. (1992).** Quality of drinking water. *B.M.J.* 304: 571.
- **RODIER, J. (1989).** *Análisis de las aguas*. Editorial Omega, Barcelona. España.
- **ROSENBERG, F. (1990).** The bacterial flora of natural mineral waters and potential problems associated with its ingestion. *Riv. Ital. Ig.* 50: 303-310.

- **ROSENBERG, F. (2003).** The microbiology of bottled water. *Clin. Microbiol. News.* 25: 41–44.
- **ROSENBERG, F.; HERNANDEZ-DUQUINO, H. (1989).** Antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* from German mineral waters. *Tox. Ass.* 4: 281-294.
- **ROTGER, R. (1997).** *Microbiología sanitaria y clínica.* Ed. Síntesis, Madrid. España.
- **ROSZAD, D.; COLWELL, R. (1987).** Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol. Rev.* 3: 365-379.
- **ROYTE, E. (2009).** *Bottlemania.* Bloomsbury. USA.
- **RUDI, K.; TANNAES, T.; VATN, M. (2009).** Temporal and spatial diversity of the tap water microbiota in a Norwegian hospital. *Appl. Environ. Microbiol.* 75(24):7855-7857.
- **SAMBROOK, J., RUSSELL, D, (2001).** *Molecular cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, USA.
- **SHAH, N.; TANG, H.; DOAK, T.; YE, Y. (2010).** Comparing bacterial communities inferred from 16S rRNA gene sequencing and Shotgun metagenomics. *WSCP.* 17: 6-18.
- **SÁNCHEZ GRANJEL, L. (1981).** *La medicina española antigua y medieval.* Ed. Universidad de Salamanca. Salamanca. España.
- **SANDERS, E.; SANDERS, C. (1997).** *Enterobacter spp:* Pathogens poised to flourish at the turn of the century. *Clin. Microbiol. Rev.* 10: 220-241.

- **SCHINDLER, P. (1994).** Enterobacteria in mineral, spring and table water *Gesund.* 56: 690-693.
- **SCHMIDT-LORENZ, W. (1976).** Microbiological characteristics of natural mineral waters. *Ann. Ist. Super. Sanita.* 12: 93-112.
- **SCHWALLER, P. ; SCHMIDT-LORENZ, W. (1980).** Flore microbienne de quatre eaux minérales non gazéifiées et mises en bouteilles. I. Dénombrement de colonies, composition grossière de la flore, et caracteres du groupe des bactéries Gram négatif pigmentées en jaune. *Zen. Bakterirol. Mikrobiol. Hyg. L. Abt. Orig. C.* 1: 330-347.
- **SCHWALLER, P.; SCHMIDT-LORENZ, W. (1981).** La flore microbienne de quatre eaux minérales non gazéifiées et mises en bouteilles. 2ème communication: Les *Pseudomonas* et autres bactéries á Gram negatif-composition fine de la flore. *Zen. Bakterirol. Mikrobiol. Hyg. Abt. Orig. C.* 2: 179-196.
- **SENIOR, D. AND DEGE, N. (2005).** *Technology of bottled water.* Blackwell publishing. Oxford. Uk.
- **SILVA, F. (2012).** *Kocuria spp.* *Rev. Chil. Infectol.* 29 (2): 215-216.
- **SILVA, J.; RAMIREZ, L.; ALFIERI, A.; RIVAS, G.; SANCHEZ, M. (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: 46-49.
- **SLADE, P.; FALAH, M.; AL-GHADY, A. (1986).** Isolation of *Aeromonas hydrophila* from bottled waters and domestic water supplied in Saudia Arabia. *J. Food. Protct.* 49: 471-476.

- **SMITH, R.; JEFFRIES, T.; ROUDNEW, B.; FITCH, A.; SEYMAUR, J.; DELPIN, M.; NEWTON, K.; BROWN, M.; MITCHELL, J. (2012).** Metagenomic comparison of microbial communities inhabiting confined and unconfined aquifer ecosystems. *Environmental Microbiology*. 14 (1): 240-253
- **SNEATH, P.H.A.; MAIR, N.S.; SHAPE, M. AND HOLT, J. (1986).** *Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology*. Vol. II. Williams & Wilkins. Baltimore. USA.
- **SOLT, I.; KIM, M.; OFFER, C. (2011).** The human microbiome. *Harefuah*. 150(5): 484-488.
- **STACKEBRANDT, E., EBERS, J. (2006).** Taxonomía parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiology Today*, 33:152-155.
- **STATISTICAL GRAPHICS SYSTEMS CORPORATION. (1992).** *User's guide Statgraphics. Version 6,0*. STSC Inc. (USA).
- **STALEY, J.; BRYANT, M.; PFENING, N.; HOLT, J. (1989).** *Bergey's Manual of sistematic Bacteriology*. Vol. III. Williams & Wilkins. Baltimore. USA.
- **STAMPI, S.; ZANETTI, F.; BERGAMASCHI, A.; DE LUCA, G. (1999).** *Comamonas acidovorans* contamination of dental unit waters. *Letf. Appl. Microbiol.* 29: 52-55.
- **STELZ, A. (1997).** Microbiological condition of bottled natural mineral waters, drinking water, as well as water from mineral springs. *Gesund.* 59: 649-655.
- **STETZENBACH, L.; KELLEY, L.; SINCLAIR, N. (1986).** Isolation, identification, and growth of well water bacteria. *Ground Water*. 24: 6-10.
- **STICKLER, D. (1989).** The microbiology of bottled mineral waters. *J. R. Soc. Health*.4: 118-124.

- **SZEWZYK, U.; SZEWZYK, R.; MANZ, W.; SCHLEIFER K. (2000).** Microbiological safety of drinking water. *Annu. Rev. Microbiol.* 54: 81-127.
- **TAMPO, D. (2004).** *Aguas envasadas*. Editorial Limusa. México.
- **TEMPERTON, B.; GILBERT, J.; QUINN, J.; MCGRATH, J. (2011).** Novel Analysis of Oceanic Surface Water Metagenomes Suggests Importance of Polyphosphate Metabolism in Oligotrophic Environments. *PLoS ONE.* 6(1): 1-14.
- **THERON J.; CLOETE T. (2002).** Emerging waterborne infections: contributing factors, agents, and detection tools. *Crit. Rev. Microbiol.* 28: 1-26.
- **TIAGO, I.; CHUNG, A.P.; VERÍSSIMO, A. (2004).** Bacterial Diversity in a Nonsaline Alkaline Environment: Heterotrophic Aerobic Populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 7378-7387.
- **TIRODISMO, I., ARVANITIDOU, M., DARDAVESSIS, T., BISIKLIS, A., ALEXIOU-DANIIL, S. (2010).** Prevalence and antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from swimming pools in northern Greece. *Eastern Mediterranean Health Journal.* 16(7):783-787.
- **TURNER, S., PRYER, K. M., MIAO, V. P. W., PALMER, J. D. (1999).** Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 46:327-338
- **TSAI, G.; YU, S. (1997).** Microbiological evaluation of bottled uncarbonated mineral water in Taiwan. *International Journal of Food Microbiology.* 37 (2–3): 137–143
- **ULLAH, A.; DURRANI, R.; ALI, G.; AHMED, S. (2012).** Prevalence of antimicrobial resistant *Pseudomonas aeruginosa* in fresh water spring

contaminated with domestic sewage. *Journal of Biological and Food Science Research*. Vol. 1. (2): 19-22.

- **UNESCO. (2003).** *Agua para todos, agua para la vida*. Informe de Naciones Unidas sobre el desarrollo de los recursos hídricos en el mundo. NY. USA.

- **UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAME GLOBAL ENVIROMENT MONITORING SYSTEM (UNEPGEMS). (2008).** *Water Quality for Ecosystems and Human Health*. Second edition. PNUMA, ERCE, UNESCO. Ontorio, Canada.

- **UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAME-WORLD HEALTH ORGANIZATION (UNEP-WHO). (1995).** *Determination of Staphylococcus aureus in sea water and sewage by the membrane filtration (MF) culture method*. Reference methods for marine pollution. Studie 28. Rev. I. UNEP-WHO. Athens. Greece.

- **URBINA, K.; ÁLVAREZ, R. (2012).** *La denominación de origen como estrategia de diferenciación para el Queso Telita elaborado en el Municipio Piar del Estado Bolívar, Venezuela*. 10th Latin American and Caribbean Conference for Engineering and Technology. Resumen. Panama City, Panama.

- **URMENETA, J.; NAVARRETE, A.; SANCHO, J. (2000).** Isolation and identification of autochthonous microbiota from a granitic aquifer and its variation after the bottling process. *Current Microbiol.* 41: 379-383.

- **UNITE STATE ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). (1986).** *Safe drinking water. Act. 86. Amendments. EPA 570/9-86-002*. Washington, D.C. USA.

- **VACHEE, A.; MOSSEL, D.; LECLERC, H. (1997).** Antimicrobial activity among *Pseudomonas* and related strains of mineral water origin. *J. Appl. Microbiol.* 83: 652-658.

- **VANTARAKIS, A.; SMAILI, M.; DETORAKIS, I.; VANTARAKIS, G.; PAPAPETROPOULOU, M. (2013).** Diachronic long-term surveillance of bacteriological quality of bottled water in Greece (1995-2010). *Food Control*. 33: 63-67.
- **VARGA, L. (2011).** Bacteriological quality of bottled natural mineral waters commercialized in Hungary. *Food control*. 22 (3):591-595.
- **VARNAN, A., SUTHERLAND, J. (1994).** *Mineral water and other bottled waters*. In: Beverage, Technology, Chemistry and microbiology. Food products. Serie Vol. 2. Ed. Chapman y Hall. London. UK.
- **VAZ-MOREIRA, I.; NUNES, O.; MANAIA, C. (2012).** Diversity and antibiotic resistance in *Pseudomonas* spp. from drinking water. *Science of The Total Environment*. 426: 366–374.
- **VELAZCO, J.; ARAQUE, M.; ARAUJO, E.; LONGA, A.; NIEVES, B.; RAMIREZ, A.; SANCHEZ, K.; VELAZCO, E. (2008).** *Manual práctico de Bacteriología Clínica*. Colección Temas Universitarios. Vicerectorado Academico. Universidad de los Andes. Mérida. Venezuela
- **VELEZ, D. (2009).** Metagenómica ¿Una oportunidad para el estudio de la diversidad microbiana en Colombia?. *Rev. Colomb. Biotecnol.* (2): 4-7.
- **VENIERI, D.; VANTARAKIS, A.; KOMNINO, G.; PAPAPETROPOUL, M. (2006).** Microbiological evaluation of bottled non-carbonated (“still”) water from domestic brands in Greece. *International Journal of Food Microbiology*. 107: 68–72.
- **VENTER CRAIG, J; REMINGTON, K.; HEIDELBERG, J.; HALPERN, A.; RUSCH, D.; EISEN, J.; WU, D.; PAULSEN, I.; NELSON, K.; NELSON, W.; FOUTS, D.; LEVY, S.; KNAP, A.; LOMAS, M.; NEALSON, K.; WHITE, O.; PETERSON, J.; HOFFMAN, J.; PARSONS, R.; BADEN-TILLSON, H.;**

PFANNKOCH, C.; ROGERS, Y.; SMITH, H. (2004). Environmental Genome Shotgun Sequencing of the Sargasso Sea. *Science*. 304: 66-74.

- **VENTURINI, A.; DEZUANI, C.; HORIQUINI, A.; DOS SANTOS, R.; PIRES, R.; GOMES, C. (2011).** Microbiological monitoring of mineral water commercialized in Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 42 (2):554-559.

- **VIDAL, J.; CONSUEGRA, A.; GOMESCASERES, L.; MARRUGO, J. (2009).** Evaluación de la calidad microbiológica del agua envasada en bolsas producida en Sincelejo. Colombia. *Rev.MVZ Cordoba*. 14 (2): 1-10.

- **VILLARI, P.; CRISPINO, M.; MONTUORI, P.; BOCCIA, S. (2003).** Molecular typing of *Aeromonas* isolates in natural mineral waters. *J. Appl. Environ. Microbiol.* 69: 697-701.

- **WALKER, A. (1992).** Drinking water-doubts about quality. *B.M.J.* 304: 175-178.

- **WARD, D. (1998).** A natural species concept for prokaryotes. *Curr. Opin. Microbiol.* 1: 271-277.

- **WARBURTON, D. (1993).** A review of the microbiological quality of bottled water sold in Canada. Part 2. The need for more stringent standards and regulations. *Can. J. Microbiol.* 39: 158-168.

- **WARBURTON, D. (2000).** Methodology for screening bottled water for the presence of indicator and pathogenic bacteria. *Food Microbiology*. 17: 3-12.

- **WARBURTON, D.; DODDS, K.; BIJRKE, R.; JOHNSTON, M.; LAFFEY, P. (1992).** A review of the microbiological quality of bottled water sold in Canada between 1981 and 1989. *Can. J. Microbiol.* 38: 12-19.

- **WARBURTON, D.; HARRISON, B.; CRAWFORD, C.; FOSTER, R.; FOX, C.; GOUR, L.; KROL, P. (1998).** A further review of the microbiological quality of bottled water sold in Canada: 1992-1997 survey results. *Int. J. Food Microbiol.* 39: 221-226.
- **WARBURTON, D.; MAC CORMICK, J.; BOWEN, B. (1994).** Survival and recovery of *Aeromonas hydrophila* in water: development of methodology for testing bottled water in Canada. *Can. J. Microbiol.* 40: 145- 148.
- **WARBURTON, D.; PETERKIN, P.; WEISS, K.; JOHNSTAN, M. (1986).** Microbiological quality of bottled water sold in Canada. *Can. J. Microbiol* 32: 891-893.
- **WARDELL, S.; BROWN, C.; FLANNIGAN, B. (1983).** *Microbes and surfaces*. In: *Microbes in the natural environments*. Ed. Slater J. H., Wittenbrery K. and Wimpenny J. W. Cambridge University Press. Cambridge. UK.
- **WEBER, W. (2003).** *Control de calidad del agua*. Editorial Reverte. Barcelona. España.
- **WILKINSON, F.; KERR K. (1998).** Bottled water as source of multi-resistant *Stenotrophomonas* and *Pseudomonas* species for neutropenic patients. *Eur. J. Cancer Care* 7: 12-14.
- **WILLIAMS, S.; SHARPE, M.; HOLT, J. (1989).** *Bergey's of Systematic Bacteriology*. Vol. 1. N Ed. Williams & Wilkins. Baltimore.USA.
- **WORLD HELATH ORGANIZATION. (WHO). (2003).** *Guidelines for safe recreational water environment*. Vol. 2. World Helath Organization. Geneva. Switzerland.
- **WORLD HELATH ORGANIZATION. (WHO). (2009).** *Water sanitation and hygiene link to health*. Fact sheet No. 330. Geneva. Switzerland.

- **WORLD HEALTH ORGANIZATION. (WHO). (2011).** *Guidelines for drinking-water quality*. Fourth edition. World Health Organization. Geneva. Switzerland.
- **WU, D.; WU, M.; HALPERN, A.; RUSCH, D.; YOUSEPH, S. ET AL. (2011).** Stalking the Fourth Domain in Metagenomic Data: Searching for, Discovering, and Interpreting Novel, Deep Branches in Marker Gene Phylogenetic Trees. *PLoS ONE*. 6(3): 1-12
- **YABUUCHI, E.; YOSHIMASA, K.; OYAIZU, H.; YANO, I.; HOTTA, H.; HASHIMOTO, Y.; EZAKI, T.; ARAKAWA, M. (1992).** Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiol. Immunol.* 36:1251–1275
- **YAMAGUCHI, M.; DE CASSIA, R.; FUMIE, S.; VATARU, C.; UEDA, T.; PRADO, B. (2007).** Yeasts and filamentous fungi in bottled mineral water and tap water from municipal supplies. *Braz. arch. biol. technol.* 50 (1): 1-9.
- **ZAMBERLAN, M.; SANTANA, R.; GUILHERMETTIC, M.; CAMARGO, I.; ENDOC, E.; NAKAMURAC, T.; NAKAMURAC, C.; PRADO, B. (2008).** Comparison of the bacteriological quality of tap water and bottled mineral water. *Int.J. Hyg. Environ. Health*. doi:10.1016/j.ijheh.2007.09.004.
- **ZANETTI, F.; DE LUCA, G.; STAMPI, S. (2000).** Recovery of *Burkholderia pseudomallei* and *B. cepacia* from drinking water. *Int. J. Food Microbiol.* 59: 67-72.
- **ZHANG, Z., SCHWARTZ, S., WAGNER, L., MILLER, W. (2000).** A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal Computational Biology*, 7(1-2):203-14.

- **ZHOU, J.; PILLIDGE, C.; GOPAL, P.; GILL, H. (2005).** Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *Int. J. Food Microbiol.* 98:211-217.

www.bdigital.ula.ve