



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI
DIRECCIÓN DE POSGRADO

**MAESTRÍA EN AGROINDUSTRIA CON MENCIÓN EN TECNOLOGÍA
DE ALIMENTOS**

MODALIDAD: INFORME DE INVESTIGACION

Título:

**Detección de patógenos en agua de consumo humano mediante la técnica
PCR**

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Magíster en Agroindustria
con mención en Tecnología de Alimentos

Autor:

Darwin Alberto Núñez Torres Mg.

Tutora:

María Monserrath Morales Padilla, MSc

LATACUNGA –ECUADOR

2023

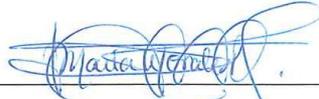
APROBACIÓN DEL TUTOR

En mi calidad de Tutor del Trabajo de Titulación “DETECCIÓN DE PATÓGENOS EN AGUA DE CONSUMO HUMANO MEDIANTE LA TÉCNICA PCR” presentado por Darwin Alberto Núñez Torres, para optar por el título Magíster en Agroindustria con mención en Tecnología de Alimentos.

CERTIFICO

Que dicho Trabajo de Titulación ha sido revisado en todas sus partes y se considera que reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a la presentación para la valoración por parte del Tribunal de Lectores que se designe y su exposición y defensa pública.

Latacunga, noviembre 15, 2023.



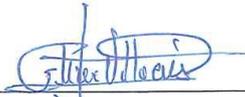
Msc. María Monserrath Morales Padilla

CC.: 0201972593

APROBACIÓN TRIBUNAL

El Trabajo de Titulación: “**DETECCIÓN DE PATÓGENOS EN AGUA DE CONSUMO HUMANO MEDIANTE LA TÉCNICA PCR**”, ha sido revisado, aprobado y autorizada su impresión y empastado, previo a la obtención del título de Magíster en Agroindustria con mención en Tecnología de Alimentos; el presente trabajo reúne los requisitos de fondo y forma para que el estudiante pueda presentarse a la exposición y defensa.

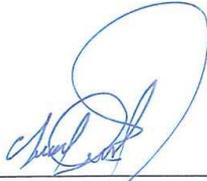
Latacunga, noviembre 15, 2023.



Ing. Clara Elena Villacrés Poveda PhD.

C.I. 1801504422

Presidente del tribunal



Ing. Edwin Fabián Cerda Andino Mg.

C.I. 0501369805

Lector 2



Ing. Manuel Enrique Fernández Paredes Mg.

C.I. 0501511604

Lector 3

DEDICATORIA

Este trabajo de investigación se lo dedico de manera especial a Dios, fuente de sabiduría y fortaleza, por guiar mis pasos y otorgarme la capacidad de alcanzar esta meta académica. Agradezco profundamente a mi familia, quienes, con su apoyo incondicional, motivación y comprensión, fueron mi sostén durante este arduo proceso. Este logro no solo es mío, sino también de aquellos que creyeron en mí y me alentaron a seguir adelante. A todos ellos, mi eterna gratitud.

Darwin Alberto

AGRADECIMIENTO

Mi agradecimiento especial a la Universidad Técnica de Cotopaxi “UTC”, la cual me abrió sus puertas para formarme profesionalmente.

A la Universidad Estatal de Bolívar, quien me apoyo en el desarrollo del trabajo experimental en el área de investigación de Bióloga Molecular.

A la Universidad Nacional de Chimborazo, por su aporte significativo por medio del proyecto de investigación que se lleva a cabo.

A mi tutora Msc. María Monserrath Morales Padilla, profesional de gran sabiduría que me incentivó a seguir adelante y que sin su apoyo esto no hubiese sido posible en todo el proceso de realización del trabajo de investigación.

Darwin Alberto

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Quien suscribe, declara que asume la autoría de los contenidos y los resultados obtenidos en el presente Trabajo de Titulación.

Latacunga, noviembre 15, 2023



Mg. Darwin Alberto Núñez Torres

C.I. 0201977576

RENUNCIA DE DERECHOS

Quien suscribe, cede los derechos de autoría intelectual total y/o parcial del presente Trabajo de Titulación a la Universidad Técnica de Cotopaxi.

Latacunga, noviembre 15, 2023



Mg. Darwin Alberto Núñez Torres

C.I. 0201977576

AVAL DEL PRESIDENTE

Quien suscribe, declara que el presente Trabajo de Titulación: “DETECCIÓN DE PATÓGENOS EN AGUA DE CONSUMO HUMANO MEDIANTE LA TÉCNICA PCR”, contiene las correcciones a las observaciones realizadas por los miembros del tribunal en la predefensa.

Latacunga, noviembre 15, 2023



Ing. Clara Elena Villacrés Poveda PhD.

C.I. 1801504422

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI
DIRECCIÓN DE POSGRADO**

**MAESTRÍA EN AGROINDUSTRIA CON MENCIÓN EN TECNOLOGÍA
DE ALIMENTOS**

Título: DETECCIÓN DE PATÓGENOS EN AGUA DE CONSUMO HUMANO MEDIANTE LA TÉCNICA PCR.

Autor: Darwin Alberto Núñez Torres

Tutor: María Monserrath Morales Padilla Msc.

RESUMEN

In this study, the presence of pathogenic microorganisms such as *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* with its O157:H7 serotype, and *Salmonella spp.* was determined in human drinking water in the Chambo canton. Selective culture media techniques and conventional Polymerase Chain Reaction (PCR) were employed. Specific primers for each pathogen were used for thermocycling, along with positive controls for contrast. A total of 50 samples from different strategic points in the area were analyzed using these methodologies. *Listeria monocytogenes* was detected in 40% (20/50) of the samples, *Escherichia coli* with its O157:H7 serotype in 80% (40/50), and *Salmonella spp.* in 20% (10/50). Thus, the quality of human drinking water in the canton was determined based on the number of contaminated points with the studied pathogens. With the obtained data, possible alternatives in the sector could be considered to reduce the microbial load in the study matrix.

PALABRAS CLAVES: PCR, Calidad del Agua, Patógenos.

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI
DIRECCIÓN DE POSGRADO
MAESTRÍA EN AGROINDUSTRIA CON MENCIÓN EN TECNOLOGÍA
DE ALIMENTOS

**Title: (DETECTION OF PATHOGENS IN HUMAN DRINKING WATER
USING PCR)**

**Author: (Darwin Alberto Núñez Torres)
Tutor: (María Monserrath Morales Padilla)**

ABSTRACT

In this study, the presence of pathogenic microorganisms such as *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* with its O157:H7 serotype, and *Salmonella spp.* was determined in human drinking water in the Chambo canton. Selective culture media techniques and conventional Polymerase Chain Reaction (PCR) were employed. Specific primers for each pathogen were used for thermocycling, along with positive controls for contrast. A total of 50 samples from different strategic points in the area were analyzed using these methodologies. *Listeria monocytogenes* was detected in 40% (20/50) of the samples, *Escherichia coli* with its O157:H7 serotype in 80% (40/50), and *Salmonella spp.* in 20% (10/50). Thus, the quality of human drinking water in the canton was determined based on the number of contaminated points with the studied pathogens. With the obtained data, possible alternatives in the sector could be considered to reduce the microbial load in the study matrix.

KEYWORD: PCR, Water Quality, Pathogens.

Josué Josafat Arévalo Peralta con cédula de identidad número:1804113676 MAGISTER EN ENSEÑANZA DE INGLES COMO LENGUA EXTRANJERA con número de registro de la SENESCYT: 1010-2023-2649054; CERTIFICO haber revisado y aprobado la traducción al idioma inglés del resumen del trabajo de investigación con el título: "DETECTION OF PATHOGENS IN HUMAN DRINKING WATER USING PCR." de: Darwin Alberto Núñez Torres, aspirante a magister en Agroindustria con mención en Tecnología de Alimentos.

Ambato/10/18/2023



Mg. Josué Josafat Arévalo Peralta
C.I. 1804113676

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Descripción	Pág.
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS	2
2.1. Área de estudio.....	2
2.2. Georreferenciación.....	2
2.3. Técnica de recolección de muestras.....	2
2.4. Preparación de muestras y cultivo inicial.....	3
2.5. Confirmación por microscopía.....	3
2.6. Extracción de ADN.....	3
2.7. Rendimiento de ADN.....	3
2.8. Preparación de muestra para <i>E. coli</i>	4
2.9. Preparación de muestra para <i>Listeria monocytogenes</i>	4
2.10. Preparación de muestra para <i>Salmonella</i> spp. en termo ciclos:	4
2.11. Reactivos para PCR	5
2.12. Ciclos para los patógenos en estudio en el termociclador.	6
2.13. Electroforesis por PCR convencional	6
3. RESULTADOS.....	7
3.1. Georreferenciación de los diferentes puntos de muestreo del Cantón Chambo.	7
3.2. Resultados microbiológicos de las muestras de los diferentes puntos de muestreo del Cantón Chambo.	9
3.3. Resultados de amplificación de PCR mediante electroforesis de <i>Escherichia coli</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Salmonella</i>	13
4. DISCUSIONES.....	15
5. CONCLUSIONES	17
6. BIBLIOGRAFÍA	18

ÍNDICE DE TABLAS

N° de Tabla	Descripción	Pág.
Tabla 1	Cebadores utilizados para realizar la PCR.....	5
Tabla 2	Reactivos PCR de los patógenos en estudio	5
Tabla 3	Ciclos para amplificación de ADN	6
Tabla 4	Puntos de muestreo del agua de consumo humano del Cantón Chambo...8	
Tabla 5	Resultados microbiológicos.	9
Tabla 6	Identificación y diferenciación microscópica mediante tinción de gram tras resultados microbiológicos de las muestras de agua de consumo humano.....	10
Tabla 7	Concentración y calidad del ADN extraído de los microorganismos de <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>E. Coli</i> , <i>Salmonella spp</i>	12

ÍNDICE DE FIGURAS

N° de tabla	Descripción	Pág.
Figura 1.	Primeros puntos de muestreo desde las nacientes de riachuelo y río	7
Figura 2.	Puntos de muestreo desde las nacientes y tanque de almacenamiento para distribución.....	7
Figura 3.	Puntos de muestreo del casco urbano del cantón Chambo.....	8
Figura 4.	Representa a las muestras contaminadas desde el P1 hasta P28	13
Figura 5	Representa a las muestras contaminadas desde el P29 hasta P46	13
Figura 6	Representa a las muestras contaminadas desde el P46 hasta P50	14
Figura 7.	Representa a las muestras contaminadas desde el P2 y hasta P40	14
Figura 8.	Representa a las muestras contaminadas desde el P44 y hasta P46	14
Figura 9.	Representa a las muestras contaminadas desde el P1 y hasta P12	14

INFORMACIÓN GENERAL:

Título del Trabajo de Titulación: DETECCIÓN DE PATÓGENOS EN AGUA DE CONSUMO HUMANO MEDIANTE LA TÉCNICA PCR.

Línea de investigación: DESARROLLO Y SEGURIDAD ALIMENTARIA

Proyecto de investigación asociado: IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS MEDIANTE M-PCR, PARA DETERMINAR LA CALIDAD DEL AGUA POTABLE DE CONSUMO HUMANO E INDUSTRIAL Y ESTABLECER UNA TÉCNICA DE PURIFICACIÓN.

Red nacional o internacional: RIMPA

1. INTRODUCCIÓN

El agua es el elemento fundamental para el desarrollo de las actividades vitales del planeta, este líquido vital está presente en una cantidad aproximada de 1.4 billones de km^3 , se debe considerar que la mayoría del agua es de característica salada y se encuentra principalmente en los océanos, siendo el 97.5% del total (Lopez, 2018).

El agua de consumo humano, y la de actividades terrestres, constituye aproximadamente el 2,5% del agua total presente en la Tierra (ACUAE, 2021). De esta cantidad de agua dulce, la mayor parte se encuentra en forma de hielo en los casquetes polares, glaciares y capas de hielo, aproximadamente el 68.7%. Las aguas subterráneas, presentes en acuíferos y depósitos subterráneos, es alrededor del 30.1%. El resto del agua dulce se encuentra en lagos, ríos, humedad del suelo y en la atmósfera (UNESCO, 2019).

En el cantón Chambo de la provincia del Chimborazo, el agua es usada para consumo humano y reguío, las condiciones antes de su tratamiento de potabilización y posterior a la misma no son las adecuadas, los riachuelos, quebradas, y fuentes hídricas, son propensas a ser contaminadas por animales en estado cadavérico, el ganado bovino, equino y porcino que se acerca a consumir agua y defecan en las fuentes hídrica, de esta manera hay una contaminación de microorganismos patógenos que afectan drásticamente la salud de los seres humanos, causando lesiones gastrointestinales graves o incluso la muerte.

La detección de patógenos en el agua potable es de gran importancia para garantizar la seguridad y la salud pública (OPS o. P., 2022). Los patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* con su serotipo O157:H7 y *Salmonella spp*, causan daños de grado gastro intestinal al ser humano (Acuña, 2018). La presencia de microorganismos patógenos en el agua de consumo humano puede provocar brotes de enfermedades transmitidas por el agua, y representar un riesgo significativo para la población (OMS, Agua para consumo humano, 2023).

La técnica biomolecular de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una herramienta ampliamente utilizada y efectiva para la detección de patógenos en

muestras de agua de consumo humano. La PCR permite amplificar y detectar de manera selectiva fragmentos específicos de ADN de patógenos, incluso en concentraciones bajas (Méndez, 2020). De este modo la presente investigación se planteó como objetivo general realizar la detección de patógenos en agua de consumo humano mediante la técnica de PCR

Al desarrollar los análisis por medio de PCR, se obtendrán datos confiables para dar un criterio acertado, del grado de contaminación que se pueden presentar en el agua de consumo humano, y así poder tomar acciones correctivas frente a estos contaminantes biológicos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Área de estudio

El presente trabajo es de carácter descriptivo, experimental, de aspecto transversal, llevado a cabo en los meses de enero a septiembre del 2023, en el cual se estudió la probabilidad de la presencia de patógenos como *Salmonella* spp., *Listeria* spp., *E. coli*, en 50 muestras de agua de consumo humano, las cuales fueron obtenidas en puntos estratégicos, desde las nacientes de agua de consumo humano hasta los hogares (Mejía, 2021).

2.2. Georreferenciación

Este método permitió ubicar la posición exacta o relativa de los diferentes puntos, en donde se realizó el muestreo. Las coordenadas fueron determinadas mediante el GPS GPSMAP 64sx que brindó los datos necesarios para ser ingresados en el programa ARcGIS donde se obtuvo un mapa digital (Alvarez, 2018).

2.3. Técnica de recolección de muestras

La recolección de muestras de agua de consumo humano, se llevó a cabo con materiales estériles de polietileno de grado alimenticio rotulados adecuadamente, manteniendo una línea de frío estricto para su transporte, y su aislamiento con los elementos naturales (NTE INEN 2176, 2013).

2.4. Preparación de muestras y cultivo inicial

Se consideraron 1000 ml del agua de consumo humano para ser sometidas a una rampa de succión, pasando por un papel filtro (SKU:09790 2E), una vez completo el proceso de succión, el papel filtro es removido para ponerse en contacto con los medios específicos para *Salmonella spp.* (XLD AGAR ISO 9001:2015 M4J2BV01 de la marca TM Media), *Listeria spp.* (CHROMOGENIC LISTERIA AGAR BASE (Modified)M1GD4HV01 ISO 9001: 2015.ISO 11133:2014 de la marca TM Media), *E coli*, (EMBAGAR, LEVINE M3H1FV01 (ISO 21150:2015) de la marca TM Media. Las cajas fueron incubadas a una temperatura de 35 C° durante 24 horas, transcurrido el tiempo se procedió la verificación de presencia o ausencia de UFC (Sánchez, 2017).

2.5. Confirmación por microscopia

Las placas que tuvieron crecimiento microbiano, fueron consideradas para la prueba de tinción de Gram, y con el uso del microscopio por la morfología del patógeno se determinó si es Gram positivo o Gram negativo (Corrales, 2020)

2.6. Extracción de ADN

Se consideraron un número aproximado de 5 colonias del patógeno, para ser suspendido en 500 µL de buffer TAE 1X, seguidamente se centrifugó a 16.000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. Para la extracción de ADN de *Listeria spp*, *E coli*, y *Salmonella spp* tanto Gram negativas y Gram positivas se usó el kit Purelink™ Genomic DNA Mini Kit, k182001 (Villota, 2022).

2.7. Rendimiento de ADN

Para saber el rendimiento del ADN se utilizó un espectrofotómetro de la marca (Thermo Scientific™ NanoDrop™ One/One espectrofotómetro de micro volúmenes de UV-Vis), el cual midió la concentración y la pureza de las muestras a partir de 1 a 1,5 µL de ácidos nucleicos o proteínas (Mancera, 2020).

2.8. Preparación de muestra para *E. coli*

La solución para *E. coli* de (R) Reverse: (*R,5'-GCTATTCCTGCCGATAAGAGA-3'*) con una concentración de 39,45 nmol y (F) forwar: (*F,5'-CCAGGCAAAGAGTTTATGTTGA-3'*) con una concentración de 37,39 nmol, se elaboró una solución de trabajo a una concentración de 10^{10} μmol , seguidamente para el desarrollo de la solución total por muestra se adicione Nuclease-Free Water según la concentración nmol, se usó un tubo eppendorf de 1.5 mL en donde se adicionó 5 μL del primer R y se aforó con 45 μL de H₂O Nuclease-Free Water, obteniendo una solución total de 50 μL que examinó el género de *Escherichia coli* con su serotipo *O157:H7* en 212 bp (Yepes, 2022).

2.9. Preparación de muestra para *Listeria monocytogenes*

Para *Listeria monocytogenes* en relación a los primer (R) Reverse (*R,5'-GCCGTCGATGATTTGAACTTCATC-3'*) con una concentración de 41,88 nmol como de (F) Forwar (*F,5'-GAATGTAACTTCGGCGCAATCAG-3'*) con una concentración de 42,05 nmol, de esta manera se elaboró una solución de trabajo a una concentración de 10^{10} μmol , se adicionó Nuclease-Free Water según la concentración nmol. Con el uso de un tubo eppendorf de 1.5 mL se adicionó 5 μL del primer R y aforamos con 45 μL de H₂O Nuclease-Free Water, obteniendo una solución total de 50 μL que reconoció el género de *Listeria monocytogenes* en 388 bp (Meghdadi & Nassirabady, 2019).

2.10. Preparación de muestra para *Salmonella* spp. en termo ciclos:

Para *Salmonella* spp. Se uso de (R) Reverse (*R,5'-TCCATCAAATTAGCGGAGGC-3'*) de 41,05 nmol y para forwar (F) (*F,5'-AACGTGTTCCGTCGTAAT-3'*) 52,15 nmol, con una concentración final de 10^{10} μmol , se adicionó Nuclease-Free Water. Con el uso de un tubo eppendorf de 1.5 mL se adicionó 5 μL del primer R y se aforó con 45 μL de H₂O Nuclease-Free Water, obteniendo una solución total de 50 μL , que reconoce el género de *Salmonella* spp. en 244 bp (Gomez & Torres, 2022).

Tabla 1*Cebadores utilizados para realizar la PCR.*

Bacteria	Secuencia	Pares de bases bp	Referencias
<i>Listeria monocytogenes</i>	(R,5'-GCCGTCGATGATTTGAACTTCATC-3') (F,5'-GAATGTAAACTTCGGCGCAATCAG-3')	388 bp	(Meghdadi & Nassirabady, 2019)
<i>Escherichia coli con su serotipo O157:H7</i>	(R,5'-GCTATTTCTGCCGATAAGAGA-3') (F,5'-CCAGGCAAAGAGTTTATGTTGA-3')	212 bp	(Nuñez & Bayas, 2019)
<i>Salmonella spp.</i>	<i>invaA3R</i> (R,5'-TCCATCAAATTAGCGGAGGC-3') <i>inva3F</i> (F,5'-AACGTGTTCCGTCGTAAT-3')	244 bp	(Gomez & Torres, 2022)

En la tabla 1 se presentan las secuencias usadas en el desarrollo del trabajo, debidamente verificadas para cada patógeno y el serotipo de interés.

2.11. Reactivos para PCR

Se puede apreciar en la tabla 2, las cantidades de los reactivos usados en la amplificación por PCR del ADN obtenido de *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.* En donde el GoTaq® Green Master Mix, 2X ya contiene una solución 2x listas para ser usadas, mismas que presentan polimerasa de ADN GoTaq®, dNTP, tampón de reacción MgCl y colorantes de color azul y amarillo.

Tabla 2*Reactivos PCR de los patógenos en estudio*

Reactivos	Volumen uni.	<i>Listeria m</i> # de muestras	<i>E – coli</i> # de muestras	<i>Salmonella spp.</i> # de muestras
GoTaq® Green Master Mix, 2X	12.5 µL			
Forwar primer, 10µM	0.25-2.5µL			
River, 10µM	0.25 2.5µL	20	40	10
DNA Templade	1-5 µL			
Nuclease-Free Wáter to	25 µL			
Volumen total		830	1660	415
		/20=41,5 µL	/40=41,5 µL	/10=41,5 µL

Nota: Trabajo investigativo.

2.12. Ciclos para los patógenos en estudio en el termociclador.

Los ciclos se desarrollaron en un termociclador (serie TC3000 20X0, 5ML, marca Techne FTC3/05, origen España) como se detalla en la tabla 3.

Tabla 3

Ciclos para amplificación de ADN

N° de ciclos	T (°C) / T <i>Listeria m.</i>	T (°C) / T <i>Salmonella spp.</i>	T (°C) / T <i>Escherichia coli</i>	Fases
1	95/2 min	95/5 min	95/30 s	Desnaturalización
	95/1 min	95/1 min	95/20 s	Desnaturalización
30	53/45 s	63/45 s	53/45 s	Unión de iniciadores
	72/ 1 min	72/1 min	72/1min	Extensión
1	72/ 7 min	72/5 min	72/2min	Extensión

Nota: (Yepes, 2022).

La tabla 3 determina las condiciones de los ciclos que se siguieron para la amplificación de las cadenas de ADN para cada patógeno en estudio.

2.13. Electroforesis por PCR convencional

Se preparó el gel de Agarosa al 1.5%, en 100 ml de TAE 1X, el gel se integró a la cuba de electroforesis con el leader de 100 pb y se adicionaron 5uL. del ADN amplificado en cada pocillo, se procedió a realizar la corrida en la cuba a 135 voltios por 30 min, una vez ya transcurrido el tiempo estimado se trasladó a la cuba de revelado sumergiendo el gel con TAE 1X y 1 µL de colorante Diamond^{MT} Nucleic Acido Dye durante 15 min y a posterior la lectura e interpretación en la foto documentador Safe transiluminador, marca invitrogen Serie12078086 con el uso de un transiluminador UV, para revelar las bandas y sus alturas (Wahjudi, 2022).

3. RESULTADOS

3.1. Georreferenciación de los diferentes puntos de muestreo del Cantón Chambo.



Figura 1. Primeros puntos de muestreo desde las nacientes de riachuelo y río



Figura 2. Puntos de muestreo desde las nacientes y tanque de almacenamiento para distribución



Figura 3. Puntos de muestreo del casco urbano del cantón Chambo.

Puntos de estudio

Tabla 4

Puntos de muestreo del agua de consumo humano del Cantón Chambo

Puntos de muestreo	Zona geográfica
P1, P2, P3, P4, P5	Noroeste- zona Montañosa –zona de aserradero y tanque de acopio
P6, P7, P8, P9, P10, P11	Noroeste -zona montañosa-Nacientes-tanque de acopio-a 200 metros de la hacienda Cubillin
P12, P13, P14, P16	Noroeste -tanques de almacenamiento - Tanques de tratamiento -Tanques de distribución
P17, P18, P19, P20, P21, P22, P23, P24	Suroeste-Primeras casas con agua potable.
P25, P26, P27, P28, P29, P30, P32, P33, P34, P50	Suroeste-calles Manuel Zabala y Egidio Fierro
P35, P36, P37, P38, P39	Sureste - Héctor Guevara y 18 de marzo
P40, P41, P42, P43, P44	Suroeste-Héctor Guevara - Edelberto Bonilla- David Parra
P45, P46, P47, P49	Suroeste-calles F -Chiriboga- Rocafuerte y García Moreno

En la tabla 4 se presentan los resultados de georreferenciación, con el uso de un GPS MAP 64sx mediante el software ArcGIS, permitiendo ubicar de manera exacta un punto de una localización geográfica mediante coordenadas específicas de las muestras tomadas en el cantón Chambo. Los puntos de muestreo fueron tomados de manera estratégica, desde el yacimiento, tratamiento y distribución en las viviendas de los habitantes.

3.2. Resultados microbiológicos de las muestras de los diferentes puntos de muestreo del Cantón Chambo.

Tabla 5

Resultados microbiológicos.

Código	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>E. Coli</i>	<i>Salmonella</i>
P1	-	+	+
P2	+	+	+
P3	+	+	+
P4	-	+	-
P5	-	+	-
P6	+	+	+
P7	+	+	+
P8	+	+	+
P9	+	+	+
P10	+	+	+
P11	+	+	+
P12	+	+	+
P13	+	+	-
P14	-	-	-
P15	-	-	-
P16	-	-	-
P17	-	-	-
P18	-	-	-
P19	+	-	-
P20	+	-	-
P21	-	-	-
P22	-	-	-
P23	+	+	-
P24	+	+	-
P25	-	+	-
P26	-	+	-
P27	-	+	-
P28	+	+	-
P29	-	+	-

P30	-	+	-
P31	+	+	-
P32	-	+	-
P33	-	+	-
P34	-	+	-
P35	+	+	-
P36	-	+	-
P37	-	+	-
P38	-	+	-
P39	-	+	-
P40	+	+	-
P41	-	+	-
P42	-	+	-
P43	-	+	-
P44	+	+	-
P45	-	+	-
P46	+	+	-
P47	-	+	-
P48	-	+	-
P49	-	+	-
P50	-	+	-

En la tabla 5 se presentan los resultados del muestreo de agua de consumo humano de los diferentes puntos del cantón Chambo, tras análisis microbiológicos con medios selectivos, cabe recalcar que se realizaron análisis por triplicado durante el proceso de investigación para así constatar la presencia de los mismos.

Tabla 6

Microscopia mediante tinción de Gram

Código	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>E. Coli</i>	<i>Salmonella</i>
P1	-	Bacilos (-)	Bacilos (-)
P2	Bacilos (+)	Bacilos (-)	Bacilos (-)
P3	Bacilos (+)	Bacilos (-)	Bacilos (-)
P4	-	Bacilos (-)	-
P5	-	Bacilos (-)	-
P6	Bacilos (+)	Bacilos (-)	Bacilos (-)
P7	Bacilos (+)	Bacilos (-)	Bacilos (-)
P8	Bacilos (+)	Bacilos (-)	Bacilos (-)
P9	Bacilos (+)	Bacilos (-)	Bacilos (-)
P10	Bacilos (+)	Bacilos (-)	Bacilos (-)
P11	Bacilos (+)	Bacilos (-)	Bacilos (-)
P12	Bacilos (+)	Bacilos (-)	Bacilos (-)

P13	Bacilos (+)	Bacilos (-)	-
P14	-	-	-
P15	-	-	-
P16	-	-	-
P17	-	-	-
P18	-	-	-
P19	Bacilos (+)	-	-
P20	Bacilos (+)	-	-
P21	-	-	-
P22	-	-	-
P23	Bacilos (+)	-	-
P24	Bacilos (+)	Bacilos (-)	-
P25	-	Bacilos (-)	-
P26	-	Bacilos (-)	-
P27	-	Bacilos (-)	-
P28	Bacilos (+)	Bacilos (-)	-
P29	-	Bacilos (-)	-
P30	-	Bacilos (-)	-
P31	Bacilos (+)	Bacilos (-)	-
P32	-	Bacilos (-)	-
P33	-	Bacilos (-)	-
P34	-	Bacilos (-)	-
P35	Bacilos (+)	Bacilos (-)	-
P36	-	Bacilos (-)	-
P37	-	Bacilos (-)	-
P38	-	Bacilos (-)	-
P39	-	Bacilos (-)	-
P40	Bacilos (+)	Bacilos (-)	-
P41	-	Bacilos (-)	-
P42	-	Bacilos (-)	-
P43	-	Bacilos (-)	-
P44	Bacilos (+)	Bacilos (-)	-
P45	-	Bacilos (-)	-
P46	Bacilos (+)	Bacilos (-)	-
P47	-	Bacilos (-)	-
P48	-	Bacilos (-)	-
P49	-	Bacilos (-)	-
P50	-	Bacilos (-)	-

En la tabla 6 se muestran los resultados de la microscopía desarrollada con el método de tinción de Gram, en donde podemos apreciar la confirmación de Bacilos Gram positivos y Gram negativos, dándonos resultados positivos o negativos en cada punto de las placas cultivadas.

Tabla 7*Concentración de ADN.*

Código	<i>Listeria monocytogenes</i> ng/μL	<i>E. Coli</i> ng/μL	<i>Salmonella</i> ng/μL
P1	-	56,8	69,5
P2	67,5	70,5	51,6
P3	98,2	68,9	87,4
P4	-	93,4	-
P5	-	76,7	-
P6	73,9	87,6	83,7
P7	68,3	101,8	78,9
P8	80,5	99,4	56,8
P9	48,9	102,5	64,8
P10	56,4	89,1	89,7
P11	78,5	97,2	47,9
P12	98,2	83,9	55,6
P13	87,4	68,7	-
P14	-	-	-
P15	-	-	-
P16	-	-	-
P17	-	-	-
P18	-	-	-
P19	102,3	-	-
P20	55,1	-	-
P21	-	-	-
P22	-	-	-
P23	87,3	54,7	-
P24	49,2	77,2	-
P25	-	94,6	-
P26	-	48,9	-
P27	-	62,4	-
P28	78,3	70,6	-
P29	-	58,9	-
P30	-	73,5	-
P31	67,4	54,6	-
P32	-	107,2	-
P33	-	65,4	-
P34	-	48,2	-
P35	63,5	75,8	-
P36	-	76,1	-
P37	-	64,9	-
P38	-	79,1	-
P39	-	89,7	-
P40	54,6	92,4	-

P41	-	100,2	-
P42	-	59,7	-
P43	-	74,8	-
P44	76,8	34,5	-
P45	-	76,0	-
P46	34,5	78,9	-
P47	-	56,7	-
P48	-	49,8	-
P49	-	56,7	-
P50	-	52,7	-

En la tabla 7 se determina la concentración de ADN extraído, de los patógenos aislados, de los puntos de estudio, mediante NanoDrop™, en donde se considera una concentración óptima no menor a 15 ng/μL, para ser tomado en cuenta para la PCR.

3.3. Resultados de amplificación de PCR mediante electroforesis de *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella*.

Resultados obtenidos a partir de la documentación fotográfica en un gel de agarosa con aislados de *Escherichia coli* y su serotipo O157:H7, considerando un control positivo (E+), con varios puntos (P) que contienen ADN amplificado, en comparación con un marcador de peso molecular de 100 pb.

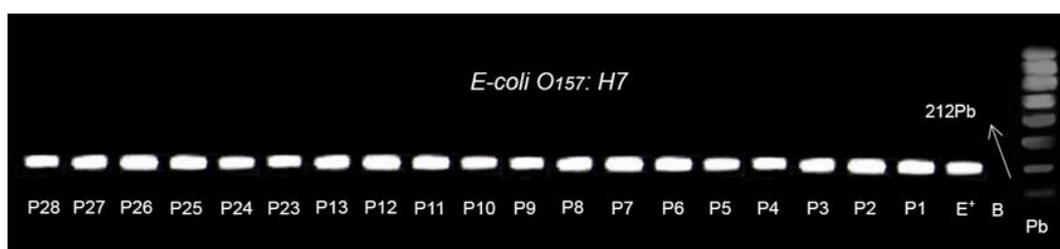


Figura 4. Representa a las muestras contaminadas desde el P1 hasta P28

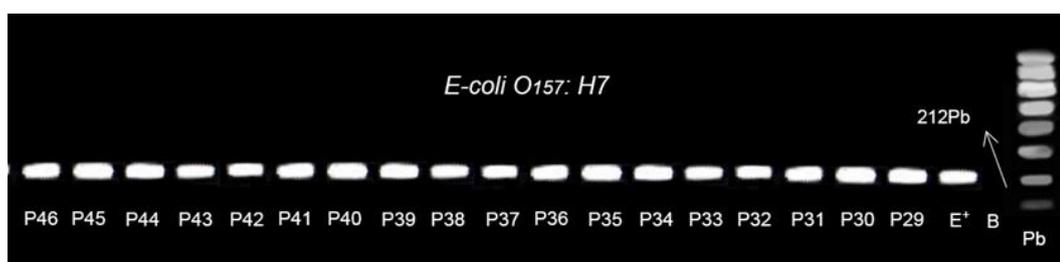


Figura 5 Representa a las muestras contaminadas desde el P29 hasta P46

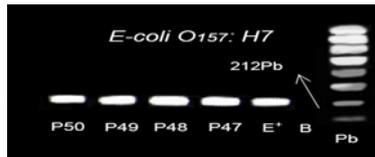


Figura 6 Representa a las muestras contaminadas desde el P46 hasta P50

Resultados obtenidos a partir de la foto documentación en gel de Agarosa con los aislados de *Listeria monocytogenes*, considerando un control positivo E+, con los diferentes puntos (P) que contienen ADN amplificado, frente al marcado de peso molecular de 100 pb.

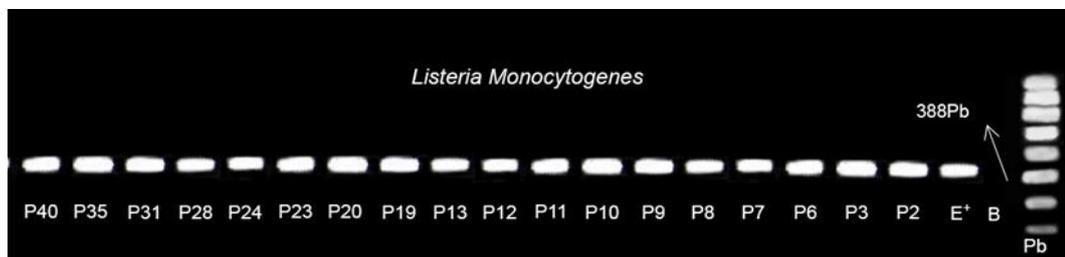


Figura 7. Representa a las muestras contaminadas desde el P2 y hasta P40

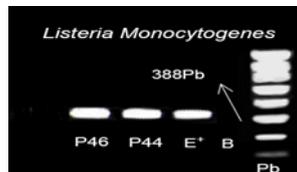


Figura 8.Representa a las muestras contaminadas desde el P44 y hasta P46

Resultados obtenidos a partir de la foto documentación en gel de Agarosa con los aislados de *Salmonella ssp.* considerando un control positivo E+, con los diferentes puntos (P) que contienen ADN amplificado, frente al marcador de 100 pb.

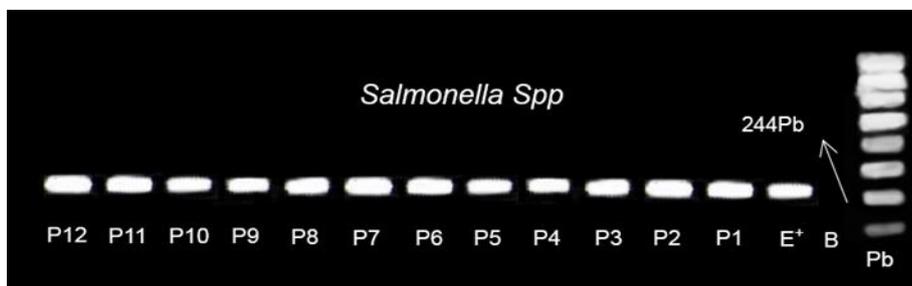


Figura 9. Representa a las muestras contaminadas desde el P1 y hasta P12

4. DISCUSIONES

La georreferenciación es importante, para identificar puntualmente las zonas de estudio, mediante los datos geográficos (Cabeza, 2022). Por tal motivo se debe considerar la georreferenciación en este trabajo con el fin de ubicar o los puntos contaminados y tomar decisiones acertadas. El método de análisis de datos por medio del programa ArcGIS, proporcionara alta confianza en la ubicación de los puntos muestreados (Llanos, 2020).

La toma de muestras es considerada como una etapa crucial en el análisis de agua, debido a posibles factores que sesgan los datos de análisis para la matriz (Silvia, 2019). En este sentido la investigación consideró el uso de envases estériles, de material de vidrio de 1000 ml, y que los mismos sean transportados y manipulados según la norma (NTE INEN 2176, 2013).

De los datos obtenidos de las muestras de agua, de la microbiología en medios selectivos, se determinó como puntos contaminados aquellos que en la placa se presentan patógenos de interés (Tobón, 2017). Esa así que los puntos que están como positivos (+) están contaminados y confirmados por microscopia de tinción de Gram (Jácom, 2014).

Para el aislamiento de los patógenos, se consideró una purificación de cepas en medios selectivos, y su conservación a -20°C (Cervera, 2011). De esta manera se garantiza que los patógenos que se estudian sean los correctos y no hayan falsos positivos (Volde, 2019).

El agua es un elemento fundamental para el desarrollo de las actividades biológicas del ser humano, la calidad de la misma debe ser la adecuada para su consumo, de esta manera se puede evitar enfermedades que afectan al consumidor y pueden llevar hasta la muerte (Guzmán, 2015), en esta investigación se comprobó la calidad del agua de consumo humano del cantón Chambo, considerando la microbiología de la matriz, basados en la norma (INEN1108, 2014), es así que a partir de los datos obtenidos se considera a este líquido vital como no apto para su consumo.

Los patógenos que pueden transmitir enfermedades en alimentos (ETA), de aspecto gastrointestinal pueden ser *Listeria monocytogenes*, *E. Coli* y *Salmonella spp.* (Torres, 2017). De los 50 puntos estudiados se pudo considerar que se detectó la presencia de *E. Coli* 40 positivas representa un 80 %, para *Listeria monocytogenes* se reconoció 20 muestras contaminadas de 50 dando un 40 %, de *Salmonella spp.* en 10 muestras contaminadas de los 50 puntos representando un 10 %, considerando así que el agua estudiada puede transmitir enfermedades tales como fiebre, tifoidea, paratifoidea y hepatitis A (Miranda, 2016).

5. CONCLUSIONES

Mediante la georreferenciación se pudo analizar la posición de las muestras tomadas de agua, con las coordenadas del GPS y analizadas por el software ARgis. En base a los puntos geo referenciados podemos considerar que el agua de consumo humano en su recorrido a la planta de tratamiento está contaminada como también después del tratamiento de la misma.

Existe contaminación con las bacterias *Escherichia coli* del serotipo O157:H7 en un 80% (40/50), seguido de *Listeria monocytogenes* con el 40% (20/50), y *Salmonella spp.* con el 20% (10/50), siendo así motivo de reconocer que el agua de consumo humano de Chambo está contaminada por las bacterias en estudio.

Se puede considerar que el agua estudiada al no cumplir con la norma INEN 1108 y INEN 1107, los factores a tomar en cuenta podrían ser el deterioro de la red distribución de agua potable, como también la cercanía de redes de agua servidas como de otros usos con esta red.

Sabiendo que hay contaminación de patógenos los cuales no son termo resistentes a altas temperaturas, se puede recomendar el consumo del agua potable con un tratamiento térmico de cocción a 88,66 °C, también se puede usar un método químico de purificación con Cl en una concentración mínima de 0,2 mg/L y máxima de 2 mg/L, INEN 409-03: 2021

6. BIBLIOGRAFÍA

- ACUAE, F. (22 de 12 de 2021). *ACUAE FUNDATION*.
- Acuña, G. C. (2018). *Bacterias*. (2, Ed.) Chile: UPAP.
- Alvarez, Y. (2018). Georreferenciación de documentos cartográficos históricos para el análisis del trazado fluvial del bajo segura, vega media (murcia, españa). (21), 101-118.
- Bayas-Morejon et al. (2019). Incidencia de Salmonella spp. en Diferentes Especies Animales y Carnes Productos en Ecuador Durante el Período 2009-2019. *J Pure Appl Microbiol*. doi:doi: 10.22207/JPAM.13.2 Cantú
- Corrales, L. C. (2020). Principios físicoquímicos de los colorantes utilizados en microbiología. *NOVA*, 18(33), 73-100.
- Darshini, M., & Pope, M. (2012). *PureLink DNA (invitrogen by life technologies*. USA.
- Ecuador, D. (01 de Noviembre de 2016). Listeriosis en el Ecuador. Quito, Ecuador .
- Gomez, J., & Torres, J. (2022). *Prevalencia y diversidad genómica de Salmonella enterica recuperada del agua de un río en una importante región agrícola en el noroeste de México*. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD), Laboratorio Nacional para la Investigación en Inocuidad Alimentaria,. Culiacan- Mexico: Javier Garaizar.
- Gould et al. (2013). Vigilancia de brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos, Estados Unidos. *Centro para el control y prevención de enfermedades*, 39 - 42.
- Guzmán, B. L. (2015). La calidad del agua para consumo humano y su asociación con la morbimortalidad en Colombia, 2008-2012. *Biomédica*, 35(2), 177-190.
- INEN1108. (2014). Agua potable. Requisitos. INEN .
- ISO 7218. (2008). *Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal*.
- ISO 7218, U. (2008). *saludneuquen*. Recuperado el 30 de 09 de 2023, de https://www.saludneuquen.gob.ar/wp-content/uploads/2021/08/UNE-EN_ISO_72182008.pdf
- Kurtz et al. (2017). Infección por Salmonella: interacción entre las bacterias y el sistema inmunitario del huésped. *Immunol Lett* , 42–50.

- Lopez, C. e. (2018). El agua para una transformación social-ecológica. (D. Christia, Ed.) *FES Transformacion*, 79.
- Mancera, P. (2020). Cuantificación de ácidos nucleicos mediante diferentes técnicas. Vhir-uat-doc-013.
- McEgan et al. (2012). Detección de *Salmonella* spp. de grandes volúmenes de agua por Moore modificado hisopos y filtración de flujo tangencial. *Letras en Microbiología Aplicada*, 56: 8894.
- Meghdadi, H., & Nassirabady, N. (2019). *Isolation and characterization of Listeria monocytogenes from*. Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Facultad de Microbiologia. Bogota: IJM Iranlan Journal.
- Mejía, L. M. (2021). Análisis microbiológico del agua para consumo humano de la población del centro poblado pachapiriana, distrito de chontalí,. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*,, 5(6).
- Méndez, Á. S. (30 de Septiembre de 2020).
- Miranda, J. P. (2016). Enfermedades transmitidas por el agua y saneamiento básico en Colombia. *Rev. Salud Pública.*, 18(5), 738-745.
- MSP. (2014). *Informe de enfermedades infecciosas durante el periodo 2013*.
- NTE INEN 2176, P. r. (2013).
- Núñez, D., & Bayas, F. (2019). *Prevalencia de Salmonella Spp. y Escherichia Coli en agua de consumo humano en Ecuador*. Universidad Estatal de Bolivar , Guaranda-Chimbo.
- Olivas et al. (2017). Fecal indicators in drinking water at Juarez Valley. *Terra latinoamericana*, 135 -143.
- OMS. (12 de Noviembre de 2015). *Estimación de la carga mundial de enfermedades transmitidas por alimentos*.
- OMS. (13 de septiembre de 2023).
- OPS. (2012). Million people die each year due to the unhealthiness of the environment, reveals the WHO report. *Organización Panamericana de la Salud*.
- OPS, o. P. (2022). *paho.org*.
- Organización Mundial de la Salud. (2011). *Guidelines for Drinking-water Quality*.
- Paudyal et al. (2017). Prevalencia de patógenos transmitidos por alimentos en alimentos de países africanos seleccionados un metanálisis. *Revista internacional de alimentos Microbiología.*, 249: 35–43.

- Ríos-Tobón, S., Agudelo-Cadavid, R., & Gutiérrez-Builes, L. (2017). Patógenos e indicadores microbiológicos de calidad del agua para consumo humano. *Fac. Nac. Salud Pública*, 236-247.
- Sánchez, E. P. (2017). Simulación y Conteo de Unidades Formadoras de colonias. *Computacion e informatica*, 6(1), 97-111.
- Shantha, S. y. (2014). Incidencia de especies de Listeria en alimentos y procesamiento de alimentos Medio ambiente: una revisión. *e Microbiología y Biotecnología*, 1 - 12.
- Stuti et al. (2019). Programa de biopelículas de Salmonella inmunidad innata para la persistencia en Caenorhabditis elegans. *Academia Nacional de Ciencias*, 116 (25) 124621246.
- Stuti et al. (2019). Programa de biopelículas de Salmonella inmunidad innata para la persistencia en Caenorhabditis elegans. *Academia Nacional de Ciencias*, 116 (25) 124621246.
- Torres, Y. F. (2017). Patógenos asociados a enfermedades transmitidas por alimentos en restaurantes escolares de Colombia. *Rev Chil Nutr*, 44(4).
- UNESCO. (23 de 8 de 2019). *Greenfact*.
- Villota, G. E. (2022). Aislamiento y caracterización de bacterias productoras de biopolímeros a partir de efluentes industriales. *Colomb. Biotecnol*, 14(1), 27-45.
- Wahjudi, M. (2022). Detection of Salmonella spp., Escherichia coli, and Listeria monocytogenes in Tuna by Multiplex PCR. *Journal of Aquaculture and Fish Health*, 11(3), 391- 401.
- Yepes, M. (2022). Validación de PCR convencional para detectar Escherichia coli O157. *Información Tecnológica*, 33(2), 3-12.