

EVALUACIÓN DE REQUISITOS PARA LA COMPETENCIA DEL LABORATORIO
DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE AGUAS PEÑAFLORES

JENNIFFER KATHERINE HERNANDEZ DUARTE



UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
PROGRAMA DE MICROBIOLOGÍA
PAMPLONA
2016

EVALUACIÓN DE REQUISITOS PARA LA COMPETENCIA DEL LABORATORIO
DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE AGUAS PEÑAFLORES

JENNIFFER KATHERINE HERNANDEZ DUARTE

PRESENTADO COMO REQUISITO PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE
MICROBIÓLOGA

Director
ÁNGELA MARITZA CAJIAO PEDRAZA
Microbióloga. Docente. Departamento de Microbiología

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
PROGRAMA DE MICROBIOLOGÍA
PAMPLONA
2016

Nota de aceptación:

Firma del Primer Jurado

Firma del Segundo Jurado

Pamplona (Norte de Santander - Colombia), 21 de Junio del 2016

DEDICATORIA

*Quiero dedicar este trabajo en primer lugar a **Dios** por permitirme lograr una de muchas metas. A mi mamá y mi tía por su amor, por sus consejos, por los valores inculcados que me identifican hoy en día como persona, por su apoyo incondicional y su lucha incalzable a diario para que mis hermanos y yo seamos personas de bien. Gracias mami a su espíritu **luchador** y su valentía, me animó a seguir adelante en las dificultades y tropiezos que se presentaron durante la carrera. A mis hermanos porque hoy representó un ejemplo de que cuando se quiere y se lucha se logran las cosas. No podría dejar de lado el gran apoyo moral, técnico y afectivo que me brindó mi amorcito en la culminación de mi carrera profesional.*

AGRADECIMIENTOS

A mi hermosa familia por creer en mí y en este sueño.

A la Universidad de Pamplona, por la oportunidad de estudiar y ser una profesional.

Infinitas gracias a los Presbíteros: Luis Alberto Rivera Hernández y Luis Morales Suárez por permitirme desarrollar la pasantía en el laboratorio de aguas y suelos Peñaflor.

A Pao Sánchez, que pacientemente me guió cuando más lo necesitaba y me transfirió sus conocimientos sin duda alguna.

A la Ing. Ruth Yesenia Quiroga por sus asesorías, por su paciencia, por ser una guía para la realización de este trabajo, porque más que mi jefa y compañera de trabajo, fue mi salvación en el avance del trabajo. A todo el personal del laboratorio Peñaflor gracias por su apoyo.

Agradecimientos a los docentes de la Universidad de Pamplona que brindaron sus conocimientos y enseñanzas, a Danny, William, Félix, Fanny, Nataly, Liliana, Raquel, y al profesor Carlos Andrés Gil por forjar mis bases para mi crecimiento a nivel profesional.

A mis suegros, cuñados y cuñadas por su gran cariño y aprecio y gracias a todas las personas que se alegran sinceramente por mi triunfo.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN.....	11
INTRODUCCIÓN.....	12
1. OBJETIVOS.....	14
1.1 GENERAL.....	14
1.2 ESPECÍFICOS.....	14
2. JUSTIFICACIÓN.....	15
3. MARCO REFERENCIAL.....	16
3.1. MARCO LEGAL.....	16
3.2. ANTECEDENTES.....	17
3.3. MARCO TEÓRICO.....	18
3.3.1. EL AGUA.....	18
3.3.1.1. Generalidades.....	18
3.3.1.2. Agua potable.....	19
3.3.1.2.1. Características físicas del agua potable.....	19
3.3.1.2.2. Características microbiológicas del agua potable.....	20
3.3.2. LABORATORIOS DE ENSAYO.....	20
3.3.2.1. Normatividad asociada a los laboratorios.....	21
3.3.2.1.1. Sistema de gestión de calidad.....	21
3.3.2.2. Buenas prácticas de laboratorio (BPL).....	21
3.3.2.3. ISO 9001.....	22
3.3.2.4. ISO-IEC 17025.....	22
3.3.2.5. Requisitos de cumplimiento en los laboratorios de ensayo.....	22
3.3.2.5.1. Infraestructura.....	22
3.3.2.5.2. Control de equipos.....	23
3.3.2.5.3. Manejo de documentación.....	23
3.3.2.5.4. Participación en el PICCAP.....	23
3.3.3. TÉCNICA DE FILTRACIÓN POR MEMBRANA.....	24
3.3.4. MICROORGANISMOS INDICADORES DE CALIDAD.....	24
3.3.4.1. Coliformes totales.....	24
3.3.4.1.1. <i>Klebsiella</i> spp.....	25
3.3.4.2. Coliformes fecales.....	25
3.3.4.2.1. <i>Escherichia coli</i>	26
3.3.4.3. Heterótrofos.....	26
3.3.4.4. VALIDACIÓN.....	27
3.3.4.5. Figuras analíticas de mérito.....	27
4. MATERIALES.....	28
4.1. Instrumentos.....	28
4.2. Materiales y Reactivos.....	28
4.2.1. Materiales.....	28
4.2.2. Medios de cultivo y reactivos.....	28
5. METODOLOGÍA.....	29

5.1. Diagnóstico técnico	29
5.3. Diseño experimental	31
5.4. Control de ambientes	32
5.5. Control de superficies	32
5.6. Cepas de referencia (Reactivación y Criopreservación)	32
5.8. Control de esterilidad de los medios de cultivo	33
5.9. Control de esterilización del autoclave	33
5.10. Estandarización del inóculo	34
5.11. Estandarización de la técnica de filtración por membrana	34
5.12. Evaluación de muestras de agua	34
5.12.1. Evaluación de <i>E. coli</i> ATCC 8739 contaminada artificialmente en agua potable.....	34
5.12.3. Evaluación de Heterótrofos utilizando la cepa de <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 4352 contaminada artificialmente en agua destilada desionizada estéril. ...	35
6. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.....	36
7. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	37
7.1. Resultados de la evaluación del diagnóstico.	37
7.2. Control de ambientes y superficies.	40
7.3. Cepas de referencia.....	41
7.4. Escala McFarland	42
7.5. Control de esterilidad	43
7.5.1. Prueba para los medios de cultivo.....	43
7.5.2. Prueba de esterilización del autoclave	43
7.5.3. Prueba de promoción de crecimiento	43
7.6. Evaluación de los parámetros con diferentes muestras de agua.....	45
7.7. Datos estadísticos experimentales.....	46
7.7.1. Límite de detección	48
7.7.2. Rango de trabajo	48
7.7.3. Repetibilidad y reproducibilidad.....	48
8. CONCLUSIONES	50
9. RECOMENDACIONES.....	51
10. GLOSARIO	52
11. BIBLIOGRAFÍA.....	53

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Equipo de filtración y filtros de membrana 0.45 μm	24
Figura 2. Morfología colonial de <i>Klebsiella pneumoniae</i> en Agar MacConkey...	25
Figura 3: Morfología colonial de <i>Escherichia coli</i> en Agar EMB.	26
Figura 4. Evaluación condiciones iniciales del laboratorio.	37
Figura 5. Evaluación de instrumentación del laboratorio	38
Figura 6. Evaluación inicial de materiales e insumos.....	38
Figura 7. Evaluación de reactivos y material de referencia certificado, con que contaba inicialmente el laboratorio.....	39
Figura 8. Evaluación de ambientes por la técnica de sedimentación empleando Agar Sabouraud + 4% glucosa y Agar Plate Count. (A) Área de incubación (B) área de siembra (C) área de incubación.	41
Figura 9. Patrón químico con $\text{BaCl}_2 + \text{H}_2\text{SO}_4$: (A) Para medir espectrofotometría (B) Para medir turbiedad.	42
Figura 10. Recuento microbiano en Agar Chromocult y Plate Count. (A) <i>Klebsiella pneumoniae</i> (B) <i>Escherichia coli</i> (C) Heterótrofos	45

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Valores físicos aceptables en el agua potable.	20
Tabla 2. Valores microbiológicos aceptables en el agua potable según la técnica empleada	20
Tabla 3. Diagnóstico inicial de calidad efectuado al laboratorio Peñafloer según la lista de chequeo y verificación del Instituto Nacional de Salud al laboratorio.	29
Tabla 4. Cronograma de actividades realizadas en el laboratorio microbiológico de aguas Peñafloer	36
Tabla 5. Evaluación de ambientes y superficies en diferentes áreas del laboratorio microbiológico de aguas Peñafloer.	40
Tabla 6. Absorbancias teóricas Vs Absorbancias experimentales bacterianas y valores de turbidez experimental.	42
Tabla 7. Características morfológicas de las cepas de trabajo.	44
Tabla 9: Porcentaje de coeficiente de variación de acuerdo a la ecuación de Horwitz	46
Tabla 10. Desviación estándar, coeficiente de variación y porcentaje de recuperación de cada parámetro evaluado usando las cepas de trabajo.	47
Tabla 11. Comparación de los resultados obtenidos por diferentes analistas en el proceso de filtración por membrana.	49

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
1. MARCACIÓN DE ÁREAS DEL LABORATORIO	58
2. PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACION DE COLIFORMES	59
3. FORMATOS DE CONTROL	60
3.1. Formato de control de autoclave	60
3.2. Formato de control de calidad de medio de cultivo.....	60
3.3. Formato de control de esterilidad de medios de cultivo	61
3.4. Formato de control del agua	61
3.5. Control de temperatura	62
3.6. Control de limpieza y desinfección de áreas.....	62
4. CERTIFICADOS DE LOS MEDIOS DE CULTIVO	63
4.1. Agar Chromocult.....	63
4.2. Agar Plate Count	64
4.3. Sabouraud + 4% glucosa.....	65
4.4. Agua peptonada bufferada	66
5. CERTIFICADO DE CEPAS	67
5.1. Certificado <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739.....	67
5.2. Certificado <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 4352.	68
6. MORFOLOGÍA	69
7. ACTIVACIÓN DE CEPAS CERTIFICADAS Y CRIOPRESERVACIÓN (CRYOBANK)	70

RESUMEN

Los laboratorios de análisis microbiológico de agua permiten mediante el desarrollo de metodologías analíticas, la detección de microorganismos de tipo bacteriano que en muchos casos son la causa de epidemias en la población cuando esta es usada principalmente para el consumo. La evaluación de requisitos para la competencia del laboratorio de análisis microbiológico de aguas Peñaflores en la validación de Coliformes y Heterótrofos por la técnica de filtración por membrana, fue efectuada con base a los lineamientos enmarcados por la Norma Técnica Colombiana NTC ISO/IEC 17025 “Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración” y los requerimientos establecidos por el Instituto Nacional de Salud, permitieron realizar la documentación de un manual de procedimiento junto a los respectivos formatos de seguimiento y control de equipos y actividades.

Asimismo, se efectuó la validación de la técnica de filtración por membrana, empleando dos cepas certificadas: ***Escherichia coli* ATCC 8739** y ***Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352** en dos tipos de muestras de agua para simular las condiciones propias de un agua potable y natural. Los resultados estadísticos obtenidos, permitieron evidenciar que la validación fue exacta, precisa y reproducible, puesto que al evaluar sus desviaciones estándar, fueron inferiores a 1 y sus coeficientes de variación no sobrepasaron el 5%, es decir se encuentran por debajo de los criterios de aceptación establecidos en la literatura científica.

INTRODUCCIÓN

El agua constituye el líquido más abundante en la tierra, representa el recurso natural más importante y la base de toda forma de vida sobre el planeta (Gaceta, 2008). Son numerosos los usos que los seres humanos dan al agua, pero sin duda entre los más significativos están el consumo, el riego de cultivos agrícolas y para cientos de industrias en el lavado de equipos, utensilios o en el caso de los alimentos, como base para la elaboración de productos.

Por esta razón para que este recurso pueda ser utilizado de forma segura en innumerables procesos, luego de someter el agua a tratamientos de purificación, se hace necesario el cumplimiento de estándares estrictos de calidad a nivel microbiológico con el fin de bacterias presentes, provenientes del contacto con aire, suelo, animales, fuentes minerales, material fecal y a nivel químico para la remoción de residuos (Romero, 2009).

Los parámetros microbiológicos constituyen el eje en el concepto de potabilización del agua y su determinación es vital en la prevención de epidemias a causa de la transmisión de enfermedades por su consumo, encontrándose generalmente virus, bacterias y parásitos. Las bacterias que se encuentran con mayor frecuencia son las de origen entérico; estas colonizan el tracto gastrointestinal del hombre y son eliminadas a través de las heces. En este grupo, se hallan los Coliformes, que incluye a los géneros: ***Escherichia spp.***, ***Enterobacter spp.***, ***Klebsiella spp.*** y ***Citrobacter spp.***, que pueden ubicarse en la capa superficial del agua o en los sedimentos del fondo.

Diversas entidades tanto a nivel nacional como internacional han estandarizado técnicas que permiten la detección de microorganismos en el agua. A nivel nacional el Instituto Nacional de Salud-INS considera el agua de consumo como un evento de interés en la salud pública, por tal razón, para que el agua pueda considerarse apta para el consumo no deberá sobrepasar los valores máximos aceptables en sus características físicas, químicas y microbiológicas (MPS-Resolución 2115, 2007).

Los laboratorios de análisis microbiológico y fisicoquímico de aguas son los encargados de realizar los diversos exámenes y procedimientos para determinar la calidad de una muestra de agua y con ello establecer el nivel de aceptabilidad y el grado de cumplimiento de acuerdo con las normas, asimismo, deben garantizar la confiabilidad de los resultados emitidos a los clientes. Por tal razón, a nivel nacional un laboratorio de ensayo que pretenda brindar el servicio de análisis de agua debe obtener como requisito mínimo la aprobación por parte de Ministerio de Salud y Protección Social y como parte de su mejora continua debe alcanzar con brevedad la acreditación bajo los estándares de la Norma Técnica Colombiana NTC ISO/IEC

17025 “Requisitos generales para la competencia de laboratorios de prueba y calibración”.

El cumplimiento de los requisitos reglamentarios relacionados con el funcionamiento de los laboratorios de ensayo que dicta la NTC ISO/IEC 17025 contempla como base la implementación de un sistema de gestión de calidad basado en la documentación, la cual juega un papel muy importante en el desarrollo de todos los procesos que se llevan a cabo, pues además de orientar sobre funciones específicas en cada área sitúan al personal del laboratorio en todas las actividades que se deben realizar (García, 2006).

Considerando la importancia de lo anteriormente expuesto, el presente trabajo se enfoca en la evaluación de los requisitos establecidos por las entidades nacionales para la competencia del laboratorio de análisis microbiológico Peñaflores ubicado en San Gil – Santander, por medio de la aplicación de listas de chequeo, el desarrollo de manuales de procedimiento, formatos de seguimiento y verificación, así como la validación de Coliformes y Heterótrofos por la técnica de filtración por membrana, con base al “*Standard methods for the examination of water and wastewater*”, utilizando la cepa ***Escherichia coli* ATCC 8739** como Coliforme fecal y la cepa ***Klebsiella pneumoniae* ATCC 4532** con doble propósito como Coliforme total y a su vez como Heterótrofo en Agar Chromocult y Plate Count, respectivamente

1. OBJETIVOS

1.1 GENERAL

Evaluar los requisitos para la competencia del laboratorio de análisis microbiológico de aguas Peñaflores en la validación de Coliformes y Heterótrofos por la técnica de filtración por membrana.

1.2 ESPECÍFICOS

- Determinar las condiciones iniciales del laboratorio microbiológico de aguas Peñaflores de acuerdo con la lista de chequeo y verificación del Instituto Nacional de Salud a los laboratorios de ensayo.
- Establecer el rango máximo permisible en el laboratorio microbiológico de aguas de las condiciones ambientales y superficiales, empleando la técnica de sedimentación e hisopado.
- Valorar el método de filtración por membrana para determinar Coliformes totales, *Escherichia coli* y Heterótrofos en aguas potables y naturales, utilizando los medios de cultivo Chromocult y Plate Count.

2. JUSTIFICACIÓN

El conocimiento sobre la calidad del agua de consumo es importante debido a los riesgos que ocasiona en la salud pública el contagio de enfermedades transmitidas a través del recurso hídrico por agentes bacterianos, virales o parasitarios presentes en ella. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) se estima que 2,9 millones de personas mueren cada año en el mundo por enfermedades causadas por falta de acceso a agua potable y saneamiento básico (MSPS, 2014).

Los procesos de desinfección realizados para destinar el agua para el consumo humano mejoran considerablemente su calidad, pero en zonas rurales aledañas a la región de San Gil-Santander se dificulta por factores económicos y geográficos, entre ellos se incluyen las vías de comunicación y el mantenimiento de los servicios de agua, que a su vez impiden el acceso a un sistema de vigilancia y control de las características microbiológicas y fisicoquímicas que debe cumplir para ser considerada como potable (Aurazo, 2004).

Hasta la fecha, se encuentran dos laboratorios cercanos a la región de San Gil, que prestan el servicio de análisis microbiológico y fisicoquímico de agua, el primero se ubica en San Gil en la Corporación Universitaria Unisangil y el segundo se localiza en el municipio de Socorro en la Universidad Libre, pero los costos de sus análisis son muy elevados.

El laboratorio microbiológico y fisicoquímico de aguas Peñaflores, busca brindar un servicio a la comunidad con menores costos y altos estándares de calidad, proporcionando información veraz y oportuna sobre la calidad del agua de la región, demostrando que esta cumple con los valores determinados por la norma vigente para agua potable – MPS, Resolución 2115 del 2007, para lo cual se hace necesario validar las técnicas microbiológicas.

3. MARCO REFERENCIAL

3.1. MARCO LEGAL

ISO 9001: 2008. Es la base del sistema de gestión de la calidad, es una norma internacional y se centra en todos los elementos de administración de calidad con los que una empresa debe contar para tener un sistema efectivo que le permita administrar y mejorar la calidad de sus productos o servicios.

ISO 17025: 2005. Esta norma establece los requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayos y/o calibración.

Una de los primeros entes regulatorios con base a la calidad del agua para consumo humano fue el **MSP-Decreto 475 de 1998** que estableció normas técnicas sobre las características organolépticas, físicas, químicas y microbiológicas del agua. Posteriormente, se creó el **MPS-Decreto 1575 de 2007**, que establece los requisitos mínimos para la autorización de los laboratorios que realizan análisis físicos, químicos o microbiológicos al agua para consumo humano y al agua contenida en estanques y de piscina para el control y vigilancia de la calidad del agua para consumo humano.

Recientemente se estableció la **Resolución 4716** del Ministerio de la Protección Social Ministerio de ambiente, vivienda y desarrollo territorial 2010 en el cual reglamenta el parágrafo del artículo 15 del **MPS-Decreto 1575 de 2007** y se establecen las condiciones, recursos y obligaciones mínimas que deben cumplir las autoridades sanitarias departamental, distrital y municipal para elaborar mapas de riesgos de calidad del agua para consumo humano.

NTC 4772 2008: Detección y recuento de *Escherichia coli* y de bacterias Coliformes: La presente norma especifica un método de referencia (ensayo estándar), como es la técnica de filtración por membrana.

MPS-Resolución 2115 de 2007: Se señalan características, instrumentos básicos y frecuencias del sistema de control y vigilancia para la calidad del agua para consumo humano a excepción del agua envasada y se estipulan los valores máximos aceptables para cada una de las características físicas, químicas y microbiológicas.

3.2. ANTECEDENTES

El laboratorio Peñaflores, es un laboratorio conformado por dos secciones de trabajo. La primera comprende el servicio de análisis fisicoquímico de suelos, dicha sección comenzó a funcionar desde el año de 1996, atiende gran parte de la región y maneja un aproximado de 1600 muestras anuales.

La segunda sección está conformada por el laboratorio de análisis microbiológico y fisicoquímico de aguas que tiene por meta obtener la aprobación por parte del Ministerio de Salud y Protección Social y constar en la resolución de laboratorios autorizados que prestan el servicio de análisis que anualmente emite el Ministerio de Salud y Protección Social. Asimismo, se pretende lograr la acreditación con la norma NTC ISO-IEC17025.

En Colombia se puede encontrar información sobre la documentación sujeta a la ISO 9001, ISO-IEC 17025 requerida para la obtención de la autorización, certificación y acreditación de los laboratorios de ensayo; así como validaciones empleando la técnica de filtración por membrana con diferentes matrices, estas son importantes porque sirven de guía para el desarrollo de este trabajo, por ende se tomó información al azar de la literatura científica, debido a que aún no existe información ni documentación sobre aguas en el laboratorio Peñaflores.

✚ El trabajo de Ortiz en el 2010 “Documentación del sistema de gestión de calidad de la empresa MONTEVITAL LTDA según NTC-ISO 9001:2008”, fue efectuado ante la necesidad de permanecer en el mercado y crecimiento organizacional de la empresa embotelladora de agua.

✚ Implementación del sistema de gestión de calidad en las pruebas realizadas en el laboratorio de análisis petrofísico con base en la norma NTC ISO 17025: 2005, realizado por Acuña en el 2009, tuvo como finalidad la creación de ventajas a nivel competitivo, mediante la acreditación del laboratorio.

✚ El trabajo de Carrillo y Lozano en el 2008, referente a la validación del método de detección de Coliformes totales y fecales en agua potable utilizando Agar Chromocult, empleó un Agar cromogénico como alternativa para la detección de microorganismos indicadores de calidad del agua potable.

✚ El trabajo “Filtración por membrana para la detección de Coliformes totales y *Escherichia coli* en aguas”, realizado por Ospino en el 2013, llevó a cabo la validación de la técnica de filtración utilizando el Agar cromogénico (Colinstant) para demostrar que es un método alternativo que reduciría costos y tiempo en los resultados.

3.3. MARCO TEÓRICO

3.3.1. EL AGUA

3.3.1.1. Generalidades

El agua como recurso natural renovable, fundamental para la vida humana y para los procesos de producción, ante la contaminación y la sobre explotación por encima de su capacidad de recarga, se convierte en un recurso escaso. De ahí la importancia de identificar, validar y difundir aquellas formas de captación, almacenamiento, distribución y conservación del agua que contribuyen a su uso racional y que son un factor clave en los procesos de desarrollo rural y manejo de los recursos naturales en los ecosistemas (Martínez, 2013).

A pesar de ello en muchas regiones, el agua se consume sin ningún tipo de control ni tratamiento ocasionando riesgos sobre la salud. Las enfermedades relacionadas con la insalubridad del agua se transmiten principalmente a través de las heces de los seres humanos y animales en particular y la falta de saneamiento son una de las causas de morbimortalidad (Yáñez, Acevedo 2013).

El informe mundial del Programa Conjunto de Monitoreo-PCM publicado en 2014 por la OMS/UNICEF, muestra que 748 millones de personas (la mayoría pobres y marginalizados) carecen de fuentes mejoradas de consumo; de ellos casi una cuarta parte de 173 millones, usan agua superficial no tratada y el 90% viven en zonas rurales. En América Latina y el Caribe cerca de 38 millones de personas no tienen acceso a fuentes de agua potable y las enfermedades de origen hídricas aparecen entre las tres principales causas de muerte, causando grandes impactos para la salud pública de la región (MSPS, 2014).

Alrededor de 1.100 millones de personas carecen de instalaciones necesarias para abastecerse de agua y 2.400 millones no tienen acceso a sistemas de saneamiento; si se llevase a cabo un suministro de agua bien regulado de conducción universal por cañerías y un saneamiento completo, se reduciría la carga en alrededor 70% por año (UNESCO, 2003).

En Colombia los departamentos con mejores condiciones del recurso hídrico en las zonas urbanas son Quindío, Bogotá D.C., Valle del Cauca, Arauca y Atlántico, mientras los que presentaron mayor deterioro de la calidad del agua en esta zona fueron Putumayo, Guainía y Vaupés. En la zona rural solamente el departamento de Antioquia presentó valores de IRCA (índice de riesgo de la calidad del agua para consumo humano) en el nivel de sin riesgo y 25 del total de departamentos mostraron un nivel de riesgo alto (80,64%) (MSPS, 2014).

Una de las causas de mortalidad se debió a enfermedades transmitidas por agua, encontrándose la Enfermedad Diarreica Aguda que afecta principalmente a niños, especialmente a menores de 5 años. A nivel nacional mostró que los casos procedían principalmente de cabeceras municipales con 55,7 % de residentes en cabecera municipal y 44,29 % en la zona rural (30,87 % ocurrieron en centro poblado y 13,42 % en rural disperso) (MSPS, 2015).

En el 2016, se han notificado al Sivigila 11 casos de muerte por enfermedad diarreica aguda (EDA) en menores de cinco años. La mayor proporción de muertes por esta enfermedad se registró en el sexo masculino con el 72,2 %, en afiliados al régimen subsidiado con el 72,7 %, en población con pertenencia étnica indígena con el 63,6 % y en área rural con el 54,5% (MSPS, 2016).

Dada la importancia de este tema para la salud humana, se hace necesario el establecimiento a escala nacional de criterios de calidad del agua de consumo humano. Estos criterios se aplicarán a todas aquellas aguas que, independientemente de su origen y del tratamiento de potabilización que reciban, se utilicen en la industria alimentaria o se suministren a través de redes de distribución pública o privada.

La finalidad del tratamiento del agua es conseguir un agua potable, que no sólo consiste en la aplicación de cloro, sino tratamientos previos como los procesos de floculación y filtración, pero esto dependerá del estado inicial en que ésta agua se recoja. Aunque a pesar del tratamiento existen sin embargo ciertas sustancias que no se pueden eliminar o que se eliminan sólo una parte. Entre los elementos químicos se encuentra el sodio y otros más nocivos como nitratos o ciertos tipos de pesticidas (Real Decreto 140, 2003).

3.3.1.2. Agua potable

Es aquella que por cumplir las características físicas, químicas y microbiológicas, es apta para consumo humano. Se utiliza en bebida directa, en la preparación de alimentos o en la higiene personal (MPS-Decreto 1575, 2007).

3.3.1.2.1. Características físicas del agua potable

No debe contener sustancias o cuerpos extraños de origen biológico, orgánico, inorgánico o radioactivo en cantidades tales que la hagan peligrosa para la salud. Deberá presentar sabor agradable y ser incolora e inodora.

En la tabla 1 se presentan las características físicas del agua potable con los valores máximos aceptables.

Tabla 1. Valores físicos aceptables en el agua potable.

CARACTERÍSTICAS FÍSICAS	EXPRESADAS COMO	VALOR MÁXIMO ACEPTABLE
Color aparente	Unidades de platino cobalto (UPC)	15
Olor y sabor	Aceptable o no	Aceptable
Turbiedad	Unidades nefelométricas de turbiedad (NTU)	2

(MPS -Resolución 2115, 2007)

3.3.1.2.2. Características microbiológicas del agua potable

Las características microbiológicas del agua para consumo humano deben enmarcarse dentro de los valores máximos aceptables presentados en la tabla 2 desde el punto de vista microbiológico, los cuales son establecidos teniendo en cuenta los límites de confianza del 95% y límite de detección desde 1 Unidad Formadora de Colonia (UFC) ó 1 microorganismo en 100 cm³. Como prueba complementaria se realiza la determinación de mesófilos cuyo valor máximo permisible es de 100 UFC/100 cm³.

Tabla 2. Valores microbiológicos aceptables en el agua potable según la técnica empleada

TECNICAS EMPLEADAS	COLIFORMES TOTALES	<i>Escherichia coli</i>
Filtración por membrana	0 UFC/100 cm ³	0UFC/100 cm ³
Enzima -sustrato	< de 1 microorganismo en 100 cm ³	< de 1 microorganismo en 100 cm ³
Sustrato definido	0 microorganismo en 100 cm ³	0 microorganismo en 100 cm ³
Presencia - ausencia	Ausencia en 100 cm ³	Ausencia en 100 cm ³

(MPS -Resolución 2115, 2007)

Por lo tanto, se debe llevar a cabo un análisis microbiológico del agua, que asegure que es apta para consumo humano y que posee las condiciones de calidad necesarias para cumplir con la normatividad gubernamental (Páez, 2008). Esto tiene como objetivo proteger a los consumidores de las enfermedades debido al consumo de agua que pueda contener patógenos, tales como bacterias, virus, protozoos, y residuos de sustancias químicas y con ello evitar brotes relacionados con el agua de consumo (Figueras, Borrego, 2010).

3.3.2. LABORATORIOS DE ENSAYO

La palabra laboratorio según el diccionario de la Real Academia Española (REA), se define como el lugar dotado de los medios necesarios para realizar

investigaciones, experimentos y trabajos de carácter científico o técnico (RAE, 2010). Específicamente los laboratorios de microbiología son diseñados para la realización de análisis de diferentes muestras, así como, para la producción de medicamentos, reactivos o la obtención de productos biológicos que deben cumplir con leyes o normas para gestionar la calidad del laboratorio.

3.3.2.1. Normatividad asociada a los laboratorios

3.3.2.1.1. Sistema de gestión de calidad

Un Sistema de Gestión de la Calidad (**SGC**) no es más que una serie de actividades coordinadas que se llevan a cabo sobre un conjunto de elementos para lograr la calidad de los productos o servicios que se ofrecen al cliente, es decir, es planear, controlar y mejorar aquellos elementos de una organización que influyen en el cumplimiento de los requisitos del cliente (Ortiz, 2010).

El laboratorio de análisis de agua, debe implementar un sistema de aseguramiento de la calidad, bien sea para certificarse en la norma ISO-9001 o acreditarse con la norma ISO/IEC-17025, presentando evidencias que soporten su implementación ante un ente regulatorio como lo es la autoridad sanitaria o el Instituto Nacional de Salud (INS), para la debida inspección, vigilancia y control a dichos laboratorios.

Estas evidencias son:

- ✚ Documento que contenga los métodos de ensayo y validación métodos.
- ✚ Procedimiento que garantice la limpieza y esterilización de los materiales hasta el momento en que van a ser usados.
- ✚ Registros que demuestren el correcto ciclo de las esterilizaciones y sus controles.
- ✚ Procedimiento que demuestre la identificación, autenticidad de las cepas, su manejo para mantener pureza y viabilidad, demostración de la estabilidad y el control de ellas.
- ✚ Certificados de pureza de los productos, expedidos por el fabricante.
- ✚ Procedimiento de entrega de muestras.
- ✚ Procedimiento para la conservación y eliminación de muestras.
- ✚ Procedimiento para la correcta disposición de los materiales contaminados de manera que no afecten a los ensayos en ejecución, las muestras para próximos ensayos, ni a las personas, ni al ambiente.
- ✚ Procedimiento para la realización del control interno de manera que pueda realizar la evaluación continua del trabajo.

3.3.2.2. Buenas prácticas de laboratorio (BPL)

Constituyen un sistema de garantía de calidad y se basan en un conjunto de reglas y procedimientos enunciadas por diferentes organismos como la OCD

(Organización para la Cooperación y Desarrollo Económicos), FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos), consideradas de obligado cumplimiento para asegurar la calidad e integridad de los datos emitidos (Rueda, 2007).

3.3.2.3. ISO 9001

Se enfoca hacia la implementación del Sistema de Gestión de Calidad basado en los procesos, es aplicable a todo tipo de organización. El hecho de certificarse le da posicionamiento al laboratorio u organización, ya que le permitirá mejorar sus aspectos organizativos y generar confianza en sus clientes, pero la certificación no establece ningún aseguramiento en cuanto a su competencia técnica (Acuña *et al*, 2009).

3.3.2.4. ISO-IEC 17025

Se encuentra diseñada para ser aplicada en los laboratorios de cualquier tipo que realicen actividades de ensayo o calibración. Esta norma contiene todos los requisitos que tienen que cumplir los laboratorios para demostrar que aplican un sistema de gestión de calidad; son competentes y sus resultados son válidos, asimismo, es necesario que se documenten todos los procedimientos pues son requisitos indispensables para la implementación de un sistema de gestión de calidad (Rodríguez, 2008).

3.3.2.5. Requisitos de cumplimiento en los laboratorios de ensayo

Los requisitos mínimos para la autorización de los laboratorios que realizan análisis físicos, químicos o microbiológicos al agua para consumo humano, incluyen:

- ✚ Infraestructura, dotación, equipos y elementos de laboratorio necesarios para realizar los análisis.
- ✚ Personal competente en esta actividad.
- ✚ Participar en el programa interlaboratorio de control de calidad del agua potable–PICCAP, que lidera el Instituto Nacional de Salud.
- ✚ Tener implementado un sistema de gestión de la calidad y acreditación por pruebas de ensayo ante entidades nacionales o internacionales que otorguen dicho reconocimiento.

3.3.2.5.1. Infraestructura

La organización debe determinar, proporcionar y mantener la infraestructura necesaria para lograr la conformidad con los requisitos del producto. La infraestructura incluye: edificios, espacios de trabajo.

3.3.2.5.2. Control de equipos

Se debe determinar el seguimiento y la medición a los equipos, para proporcionar la evidencia de su funcionalidad y asegurar con ello la validez de los resultados, realizando calibraciones y verificaciones con patrones de calidad.

3.3.2.5.3. Manejo de documentación

El laboratorio debe contar con un sistema documental actualizado, con base a un sistema de calidad, en este se evidenciarán todas las actividades que influyan en los resultados y deberán permitir el control y seguimiento de actividades.

3.3.2.5.4. Participación en el PICCAP

El PICCAP es una competencia de interlaboratorios, busca garantizar la confiabilidad de los resultados analíticos que entregan los laboratorios de análisis de aguas, evaluando su desempeño, mediante el seguimiento de sus resultados a través del tiempo y además promueve la estandarización de metodologías analíticas para la valoración de la calidad del agua. Por consiguiente, el MPS - Decreto 1575 del 2007 y la ISO 17025 solicitan que los laboratorios públicos y privados que prestan o deseen prestar el servicio de análisis físico, químico y microbiológico al agua para consumo humano, debe hacer partícipe de esta prueba (MSPS, 2014).

El *Standard Methods* contempla varias técnicas para el análisis de aguas, encontrándose: Enzima–sustrato, sustrato definido, presencia-ausencia y filtración por membrana. Esta última fue la técnica empleada para el proceso de validación.

La norma NTC 4772 especifica un método de referencia (filtración por membrana) y se emplea un medio de cultivo de diferenciación para luego efectuar el recuento del número de colonias (UFC) en la muestra de agua (NTC 4772, 2008). Los géneros ***Enterobacter***, ***Klebsiella***, ***Citrobacter***, y ***Escherichia*** generalmente están representados en la mayoría de los aislamientos hechos de los suministros de aguas municipales crudas y tratadas.

3.3.3. TÉCNICA DE FILTRACIÓN POR MEMBRANA



Figura 1. Equipo de filtración y filtros de membrana 0.45 µm
Fuente: Autor

La técnica de filtración por membrana (FM) es altamente reproducible, se puede utilizar para probar relativamente grandes volúmenes de muestra y por lo general produce resultados numéricos más rápidamente que el procedimiento de fermentación en tubos múltiples. La técnica de FM es extremadamente útil en el monitoreo de agua potable y una variedad de aguas naturales.

La técnica está completamente aceptada y aprobada como procedimiento para el monitoreo de la calidad del agua en muchos países. Este método consiste en la filtración de la muestra de agua a través de una membrana estéril con un poro de diámetro igual a 45 µm, el cual retiene las bacterias, esto gracias a una bomba de vacío que ejerce presión sobre la muestra de agua haciendo que pase a través de la membrana porosa (APHA-AWWA-WEF, 2005). Esta membrana se incuba sobre la superficie de un medio selectivo y posteriormente, se enumeran las colonias típicas crecidas sobre la membrana (Larrea *et al.*, 2013).

3.3.4. MICROORGANISMOS INDICADORES DE CALIDAD

3.3.4.1. Coliformes totales

El grupo de Coliformes se compone de varios géneros de bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*. Este grupo corresponde a todas las bacterias Gram-negativas, anaerobias facultativas, en forma de bastoncillos, no formadoras de esporas que fermentan la lactosa y la formación de gas y ácido dentro de 48 horas a 35 +/- 2 °C. La prueba estándar para el grupo de Coliformes puede llevarse a cabo ya sea por el método de presencia-ausencia o por la técnica de filtración por membrana (**FM**) o por la prueba de sustrato enzimático para Coliformes (APHA-AWWA-WEF, 2005).

3.3.4.1.1. *Klebsiella* spp.

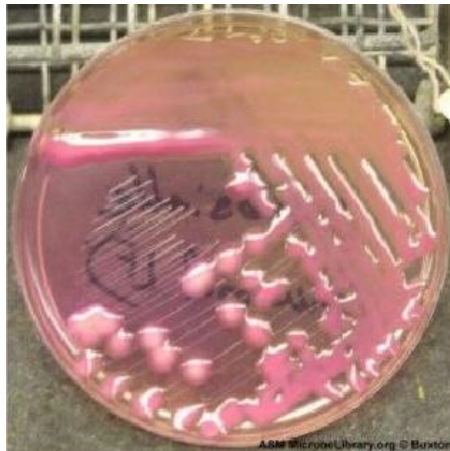


Figura 2. Morfología colonial de *Klebsiella pneumoniae* en Agar MacConkey Tomado de: Peña M. Características macroscópicas de bacterias.

Pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* y se incluyen en el grupo de Coliformes totales. Los Coliformes son comúnmente asociados al crecimiento dentro de los sistemas de distribución de abastecimientos de aguas. *Klebsiella* spp. puede ser un patógeno oportunista y dar lugar a una bacteriemia, neumonía, infecciones urinarias y otros tipos de infecciones. Aproximadamente del 60 al 80% del total de *Klebsiella* spp. de las heces y de muestras clínicas son positivos en la prueba de Coliformes fecales y son *Klebsiella pneumoniae*. Están ampliamente distribuidos en la naturaleza, se encuentran en el suelo, el agua y la vegetación (OMS, 2006).

3.3.4.2. Coliformes fecales

Subgrupo de las bacterias del grupo Coliforme, presentes en el intestino de animales de sangre caliente y humanos. Su origen es esencialmente fecal, tienen la capacidad de fermentar la lactosa, con producción de ácido y gas a $(44,0 \pm 0,2$ °C) en 24 horas de incubación. Incluye a *Escherichia* spp. y en menor grado las especies de los géneros de *Klebsiella* spp, *Enterobacter* spp y *Citrobacter* spp; estas últimas tienen una importante función secundaria como indicadores de la eficacia en los procesos de tratamiento del agua para eliminar las bacterias fecales, indican la calidad del agua tratada y la posible presencia de contaminación fecal (Pullés, 2014).

3.3.4.2.1. *Escherichia coli*



Figura 3. Morfología colonial de *Escherichia coli* en Agar EMB.
Tomado de: Peña M. Características macroscópicas de bacterias.

Es un miembro del grupo de bacterias Coliformes fecales. Este microorganismo en el agua indica contaminación fecal. Los ensayos enzimáticos permiten la identificación de este organismo. En este método de *E. coli* se definen como bacterias que poseen la enzima β -glucuronidasa y son capaces de escindir el sustrato fluorogénico 4-metilumbeliferil- β -D-glucorónido (MUG) con la liberación correspondiente del sustrato fluorogénico cuando se incubaba en EC- MUG a 44,5 °C por 24 \pm 2 horas o menos. El procedimiento se utiliza como prueba de confirmación después del enriquecimiento previo en un medio de presunción de bacterias Coliformes totales. (APHA-AWWA-WEF, 2005). En la morfología de las colonias de *Escherichia coli* en el Agar EMB (Eosina Azul de Metileno), exhiben un brillo verde metálico característico debido a la rápida fermentación de la lactosa (Merck®), dicha morfología se observa en la figura 3.

3.3.4.3. Heterótrofos

Los Heterótrofos son organismos, incluyendo bacterias, levaduras y mohos, que requieren una fuente externa de carbono orgánico para el crecimiento (Bartram *et al.*, 2003), abundan en el agua, incluidas el agua tratada y de grifo; poseen gran capacidad de adaptación, pueden tolerar condiciones adversas de suministro de oxígeno y permanecer más tiempo que otros microorganismos en el agua. Son indicadores de la carga total bacteriana, que favorece el recuento de bacterias viables a 37°C en 48 horas de incubación. Mediante este indicador se obtiene información útil que se estudia junto con el índice de Coliformes, para controlar un determinado proceso o para verificar la calidad del tratamiento, desinfección o descontaminación (Pullés, 2014).

3.3.4.4. VALIDACIÓN

La validación de un método es la confirmación, a través del examen y el aporte de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto (ISO-IEC 17025). El cual proporciona un alto grado de confiabilidad y veracidad en la técnica empleada.

Mediante la validación se evalúa el desempeño de la técnica microbiológica empleada (filtración por membrana) para garantizar la disminución del margen de error en los procedimientos, siendo en este caso la realización de una validación de tipo secundaria, la cual permite la verificación de la técnica creada y documentada en "*Standard methods for the examination of water and wastewater*".

3.3.4.5. Figuras analíticas de mérito

Los parámetros de rendimiento se establecen de acuerdo a la categoría a la que pertenece el método y siguiendo los requisitos exigidos por los diferentes organismos internacionales, en el presente trabajo se tuvieron en cuenta los siguientes parámetros: intervalo de trabajo, límite de detección, precisión, repetibilidad, exactitud, reproducibilidad. A continuación se describe cada uno de ellos: (OGA, 2007).

✚ **Límite de detección:** Concentración mínima del analito que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada.

✚ **Exactitud:** Proximidad de la concordancia entre el resultado de una medición y un valor verdadero del mensurado.

✚ **Precisión:** Es el grado de concordancia entre los resultados independientes de una medición, obtenidos en condiciones estipuladas, ya sea de repetibilidad o de reproducibilidad y depende de la distribución de los resultados sin estar relacionada con el valor verdadero. La precisión de un método microbiológico habitualmente se expresa como desviación estándar o desviación estándar relativa (coeficiente de variación).

Dentro del término precisión del método se pueden distinguir dos tipos de estudios: (Real Decreto 140, 2003)

✚ **Repetibilidad:** La repetibilidad expresa la precisión bajo las mismas condiciones de operación en un periodo corto de tiempo (misma muestra, mismo analista, mismo laboratorio, mismo equipo, mismo día, etc.).

✚ **Reproducibilidad:** Se entiende como el desarrollo del procedimiento o método analítico en diferentes laboratorios, diferentes analistas. Se expresa con los mismos parámetros matemáticos que la repetibilidad.

4. MATERIALES

4.1. Instrumentos

La validación de la técnica de filtración por membrana se realiza mediante el uso de un autoclave marca PAFFOR para la respectiva esterilización de materiales, una cabina de flujo laminar horizontal para efectuar la siembras y evitar la contaminación cruzada, un espectrofotómetro HACH® modelo DR 1900 y turbidímetro HACH® modelo 2100 P para establecer un comparativo a nivel químico (McFarland) y bacteriano, una balanza analítica OHASUS para el respectivo pesaje en la preparación de medios de cultivos, un equipo de filtración marca NALGENE®, quizás el más importante porque permite el filtrado de las muestras contaminadas artificialmente y finalmente una Incubadora WTB Binder para exponer las muestras procesadas a una temperatura de 37°C.

4.2. Materiales y Reactivos

4.2.1. Materiales

Frascos Schott de 250 mL, micropipeta BRAND de 0,5 a 5 mL, puntas esterilizables, asas rectas, asas redondas, balones aforados LMS de 100, 250 y 1000 mL, cajas de Petri de 90mm y 55 mm de diámetro, pinzas esterilizables, y filtros de membrana MERCK® con tamaño de poro de 0.45 µm.

4.2.2. Medios de cultivo y reactivos

Se utiliza el Agar Chromocult (MERCK®), Agar Plate Count (MERCK®), Agar Sabouraud + 4 % de glucosa (MERCK®), Agua peptonada bufferada (MERCK®) para el crecimiento de los diferentes microorganismos empleados en la validación y los colorantes de tinción de Gram marca Químicos Albor, para efectuar el proceso de microscopía.

5. METODOLOGÍA

Para la evaluación de los requisitos de competencia del laboratorio de análisis microbiológico Peñaflo, se efectuó un diagnóstico referente a la documentación requerida por el Instituto Nacional de Salud (INS) para el proceso de verificación de cumplimiento de los requisitos en los laboratorios de ensayo.

5.1. Diagnóstico técnico

Se determinó el estado inicial del laboratorio microbiológico de aguas Peñaflo por medio de la evaluación de los ítems de cumplimiento o incumplimiento enmarcados en la lista de chequeo del INS respectivamente y con ello proceder a tomar acciones oportunas. En la tabla 3 se presenta el diagnóstico aplicado en el laboratorio.

Tabla 3. Diagnóstico inicial de calidad efectuado al laboratorio Peñaflo según la lista de chequeo y verificación del Instituto Nacional de Salud al laboratorio.

1. CONDICIONES INICIALES	OBSERVACIONES	BPL			
		C	NC	P	NA
1.1. Dispone de áreas de lavado de material que garanticen el lavado del mismo y eviten la contaminación cruzada.					
1.2. Tienen previsto un plan de recolección, almacenamiento, disposición de residuos peligrosos de acuerdo con la normatividad vigente para la protección al medio ambiente					
1.3 Dispone de sistemas que garanticen condiciones ambientales, si éstas afectan la calidad de los resultados, deberán controlarse y registrarse.					
1.4. Tiene establecido el acceso restringido y se encuentra debidamente señalizado.					
2. REQUISITOS DE LOS EQUIPOS E INSTRUMENTOS	OBSERVACIONES	BPL			
		C	NC	P	NA
2.1. El laboratorio cuenta con los equipos necesarios para la aplicación de las pruebas y ensayos, acordes con los niveles de exactitud requeridos.					
2.2. Los equipos del laboratorio se encuentran debidamente identificados y localizados.					

2.3. Se dispone de programas de verificación intermedia para los instrumentos y equipos de medición.					
2.4. Tiene el laboratorio un programa de mantenimiento de equipos y calibración de instrumentos de medición.	OBSERVACIONES				
2.5. Se dispone del manual del fabricante y de las instrucciones actualizadas sobre uso y mantenimiento de los equipos e instrumentos de medición.					
3. REQUISITOS DE LOS MATERIALES E INSUMOS	OBSERVACIONES	BPL			
		C	NC	P	NA
3.1. Conoce el laboratorio el comportamiento de los materiales que entran en contacto con las muestras y con los diferentes reactivos.					
3.2. Dispone el laboratorio de los procedimientos para la limpieza y desinfección de los materiales utilizados en pruebas biológicas y microbiológicas.					
3.3. Se realiza la verificación periódica del estado de calibración de material volumétrico utilizados rutinariamente en el laboratorio (micropipetas, pipetas, balones aforados, tituladores)					
3.4. Dispone el laboratorio de la información sobre el uso adecuado de los materiales volumétricos para prevenir errores en la medición.					
3.5. Tiene el laboratorio pipeteadores adecuados					
4. REQUISITOS DE LOS REACTIVOS, PATRONES Y MATERIALES DE REFERENCIA.	OBSERVACIONES	BPL			
		C	NC	P	NA
4.1. Todos los reactivos y medios utilizados en el laboratorio son de calidad acorde con las exigencias dadas por los métodos aplicados rutinariamente.					
4.2. Los reactivos son adquiridos a proveedores adecuados, seleccionados y evaluados.					
4.3. En la compra de los reactivos y medios se exige el certificado de análisis, certificados de trazabilidad y lote que permita hacer seguimiento y control.					
4.4. Los reactivos y medios de cultivo que se preparan en el laboratorio se realizan de acuerdo con las directrices especificadas en el método.					

4.5. La identificación de los reactivos y medios de cultivo preparados en el laboratorio tiene la información suficiente para realizar la trazabilidad correspondiente.					
4.6. El laboratorio verifica en la recepción de los reactivos y patrones que corresponde a la calidad solicitada y que los sellos de seguridad se encuentran en buen estado.					
4.7. El laboratorio tiene definida la calidad del agua que requiere para los ensayos y para la preparación de soluciones y controla el cumplimiento de estas especificaciones.					
4.8. Se dispone de patrones de referencia para las verificaciones intermedias de instrumentos de medición.					
4.9. Se dispone de los patrones necesarios para el seguimiento rutinario en la aplicación de las metodologías del laboratorio.					
4.10. Los patrones y materiales de referencia certificados, los secundarios y los de trabajo con que cuenta el laboratorio satisfacen las necesidades de las metodologías aplicadas.					
5. SISTEMA DE GESTION DE LA CALIDAD Y ACREDITACION POR PRUEBAS DE ENSAYO (SGC)					
5.1. El laboratorio está certificado en un Sistema de Gestión de la Calidad?	SI _____				
	Cuál? _____				
	NO _____				

C: Cumple **NC:** No Cumple **CP:** Cumple Parcialmente **N.A:** No Aplica
Fuente: Basado en el programa de vigilancia por laboratorio de la calidad de agua para consumo humano. INS. 2011.

5.2. Validación

Se realizó la validación de tres parámetros: Coliformes totales, *E. coli* y Heterótrofos en aguas potables y naturales por el método de Filtración por Membrana, los ítems del STANDARD METHODS 9222 B Y 9215 D (APHA-AWWA-WEF, 2005).

5.3. Diseño experimental

Se realizó un estudio experimental basado en el *Standard Methods*, con el fin de lograr la validación del método de filtración por membrana, para la detección de Coliformes totales, *E. coli* y Heterótrofos utilizando el Agar Chromocult y Agar Plate Count en el laboratorio de aguas y suelos Peñaflo, siendo una validación de tipo concurrente, debido a que la información fue obtenida durante el tiempo que duro

el estudio, realizando análisis previos a las dos matrices empleadas durante el proceso de validación (Agua potable y Agua destilada desionizada ésteril).

5.3.1. Población de estudio y muestra población

El estudio de validación se realizó en el laboratorio microbiológico de aguas Peñaflores ubicado en San Gil-Santander, con muestras de agua potable y agua destilada ésteril, inoculadas con un número conocido de microorganismos.

Se emplearon dos cepas certificadas de 2 microorganismos para la validación de la técnica de filtración por membrana.

-  ***Escherichia coli* ATCC 8739**
-  ***Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352**

5.4. Control de ambientes

Realizada por el método de exposición de cajas de Petri de 90 mm de diámetro con los medios de cultivo: Agar Plate Count (PCA) para Aerobios mesófilos y para Mohos y Levaduras (Sabouraud + 4% glucosa) en las tres principales áreas de trabajo del laboratorio (área de siembra, área de esterilización y área de incubación), el tiempo fue de 15 minutos. Las cajas con Agar PCA se incubaron a 37°C por 24 horas y las cajas con Agar Sabouraud se dejaron a temperatura ambiente durante 5 días. Estos controles se realizaron 2 veces a la semana por un tiempo de 2 meses para establecer un rango permisible en el laboratorio Peñaflores (Scharlab).

5.5. Control de superficies

Mediante la técnica de hisopado o con escobillón en 10 mL de agua peptonada bufferada preparada al 1%, se realizó un barrido en las tres principales áreas de trabajo mencionadas con anterioridad para control de ambientes. El área fue de 100 cm². Posteriormente, se transfirió 0,1 ml a los medios de cultivo PCA, Chromocult (CHR) y Sabouraud + 4% de Glucosa, realizando una siembra en superficie y con ello, determinar la presencia de Aerobios mesófilos, Coliformes totales, ***Escherichia coli***, Mohos y Levaduras. Las cajas de Petri se incubaron a 37°C por 24 horas y para mohos y levaduras temperatura ambiente por 5 días (Scharlab).

5.6. Cepas de referencia (Reactivación y Criopreservación)

Se utilizaron cepas de referencia de la casa comercial Microbiologics®, las cuales tienen presentación de 2 unidades, cada una con un stock del microorganismo de interés en cuarto pase. Las cepas seleccionadas fueron: ***Escherichia coli* ATCC 8739**, ***Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352**.

La reactivación de las 2 cepas se realizó de acuerdo al procedimiento establecido por la casa comercial, las cuales fueron sembradas en el medio de cultivo PCA y durante un tiempo de incubación de 18 horas. Posteriormente, se llevó a cabo la criopreservación de cada microorganismo, para ello se tomó una asada grande de las colonias sembradas en el medio de cultivo PCA y luego se introdujeron en el medio que contienen cada tubo de Cryobank; se agitaron vigorosamente los tubos para propiciar la adherencia de cada microorganismo a las perlas contenidas en los tubos. Con una pipeta estéril se removió todo el medio del tubo de Cryobank, e inmediatamente se almacenaron a una temperatura de preservación (-4°C).

5.7. Elaboración patrón químico McFarland

Para la realización de la escala McFarland, se tomó diferentes volúmenes de BaCl₂ a una concentración de 0,048M (1,175% P/V BaCl₂*2H₂O) y volúmenes de H₂SO₄ al 0,18 M (0,36 N) posteriormente se realizó una curva de 6 concentraciones (0,5-5). Finalmente, se leyó las absorbancias en espectrofotómetro HACH DR 1900 a 625 nm. El patrón McFarland 0,5 se preparó adicionando 0,5ml de BaCl₂ 2H₂O a 99,5 ml de H₂SO₄. Para la preparación de los demás patrones químicos se aumentó el volumen de BaCl₂ 2H₂O, mientras que la cantidad de H₂SO₄ se le iba disminuyendo (McFarland, 1907).

5.8. Control de esterilidad de los medios de cultivo

A los medios de cultivo utilizados: Agar Chromocult (**CHR**), Agar Plate Count (**PCA**), Agar Sabouraud + 4% de glucosa (**SB**), se les realizó prueba de esterilidad. Una vez preparados los medios de cultivo según las indicaciones de la casa comercial MERCK® y posterior esterilización a 121°C/ 15 PSI durante 15 minutos, se tomó una caja de cada medio de cultivo por cada lote preparado y se incubaron a 37°C por 24 horas las cajas con Agar CHR y PCA y a temperatura ambiente por 5 días las cajas con SB + 4% de glucosa y se reportaron los resultados de acuerdo al color de las colonias presentes en el Agar Chromocult. Los Coliformes totales se observaron como colonias rojas-rosadas y los Coliformes fecales (*E. coli*) como colonias azules-violáceas (MERCK®).

5.9. Control de esterilización del autoclave

Con el fin de verificar que los equipos estuviesen alcanzando la temperatura óptima para los procesos de esterilización, se realizaron controles con cinta indicadora de la casa comercial **3M** colocando una fracción de cinta en el material a esterilizar y al terminar el proceso, se debía evidenciar el cambio de color de la cinta esterilométrica indicativo de que el proceso de esterilización se efectuó de manera exitosa.

5.10. Estandarización del inóculo

Se realizaron aislamientos de los dos microorganismos de interés en la validación, sembrándolos en Agar Plate Count e incubando a una temperatura de 37°C, con las cepas obtenidas se realizó una suspensión, para ello se escogió el patrón 0,5 de McFarland que teóricamente indicaba la existencia de una concentración bacteriana de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. A partir de un cultivo joven de 18 horas, se tomaron 30 colonias de *Escherichia coli* ATCC 8739, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352 y se adicionaron a frascos Schott con 100 mL de agua potable, luego se compararon cualitativamente con el tubo del patrón químico de McFarland 0,5. Una vez ajustada con respecto al patrón, se tomó de cada tubo un volumen y se leyó tanto por espectrofotometría a 625 nm como por turbidimetría. Conocidas las absorbancias de experimentales bacterianas, se realizaron diluciones seriadas en base 10 hasta la extinción.

5.11. Estandarización de la técnica de filtración por membrana.

El procedimiento de la técnica de filtración por membrana se realizó de acuerdo a lo descrito en los ítems 9222 B y 9215 D por el *Standard Methods* (APHA-AWWA-WEF, 2005).

5.12. Evaluación de muestras de agua.

5.12.1. Evaluación de *E. coli* ATCC 8739 contaminada artificialmente en agua potable.

La cepa fue inoculada en 100 mL de una muestra de agua potable (se aseguró la ausencia de Coliformes a través de análisis previos, datos no mostrados), luego fue ajustada a 0,5 McFarland, seguido a ello se realizaron diluciones seriadas hasta la extinción sobre frascos Schott con 90 mL agua. Posteriormente, se efectuaron las filtraciones de las 3 últimas diluciones donde se podía realizar conteo de colonias, procediendo de la menos concentrada a la más concentrada, empleando el equipo de filtración y membranas de 0.45 µm. Finalmente se sembró en Agar Chromocult. Los ensayos se realizaron por duplicado.

5.12.2. Evaluación de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352 contaminada artificialmente en agua potable.

Se realizó el mismo procedimiento para evaluar a *E. coli* ATCC 8739, con la diferencia de que la cepa inoculada fue *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352.

5.12.3. Evaluación de Heterótrofos utilizando la cepa de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352 contaminada artificialmente en agua destilada desionizada estéril.

La normatividad colombiana permite cierto valor de Mesófilos o Heterótrofos en el agua potable, siendo de 100 UFC/100mL, por ende se trabajó con muestras de agua destilada desionizada estéril y se aplicó el mismo procedimiento desarrollado para evaluar a *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352 y *E. coli* ATCC 8739, con la excepción de que se sembró en Agar Plate Count.

5.13. Prueba de repetibilidad y reproducibilidad.

La prueba se ejecutó de la siguiente manera: partiendo de volúmenes de 30mL y 40 mL con concentraciones $1,5 \cdot 10^8$ UFC/mL fueron diluidas en volúmenes de 900 mL y 750 mL de agua potable, esto con el fin de lograr una concentración bacteriana menor para cada uno de los microorganismos en estudio. Posteriormente se hizo diluciones en base 10 hasta la extinción y por último se filtró e incubó en los respectivos medios de cultivo. La prueba de repetibilidad se desarrolló con un analista y la prueba de reproducibilidad con dos analistas. Se ejecutó 3 repeticiones para reproducibilidad y 5 para repetibilidad por cada microorganismo (Páez, 2008).

6. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Tabla 4. Cronograma de actividades realizadas en el laboratorio microbiológico de aguas Peñaflor

ACTIVIDADES	OCT.			NOV.				DIC.				ENERO				FEB.				MAR.				ABRIL				MAY			JU N
	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	4	3
Inducción	X	X																													
Inicio de la pasantía	X	X																													
Lavado de material	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X					X	X	X	X	X	X	X	X	X	X							
Limpieza y desinfección del laboratorio	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X					X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X				
Manual de procedimientos				X	X	X																									
Formatos					X	X																									
Marcaje de las áreas de laboratorio								X																							
Criopreservación de cepa <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 4352								X																							
Estandarización de la escala McFarland								X	X																						
Prueba ambientes y superficies					X	X	X	X	X						X	X	X														
Criopreservación de cepa <i>E. coli</i> ATCC 8739															X																
Preparación material filtración por membrana															X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X						
Filtración cepa <i>E. coli</i> ATCC 8739 en Agar Chromocult															X	X	X														
Filtración cepa <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 4352 en Agar Chromocult																X	X	X													
Filtración de Heterótrofos en Agar Plate Count																X	X	X													
Filtración cepa <i>E. coli</i> ATCC 8739 + <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 4352 en Agar Chromocult																X	X	X													
Prueba de repetitividad y reproducibilidad															X	X	X	X	X	X	X										
Elaboración Informe											X	X	X						X	X	X	X	X	X							
Entrega Informe																												X	X	X	
Sustentación																														X	

Fuente: Autor

7. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

7.1. Resultados de la evaluación del diagnóstico.

En la figura 4 muestra el diagnóstico inicial de calidad realizado al laboratorio Peñaflores según la lista de chequeo y verificación del Instituto Nacional de Salud.

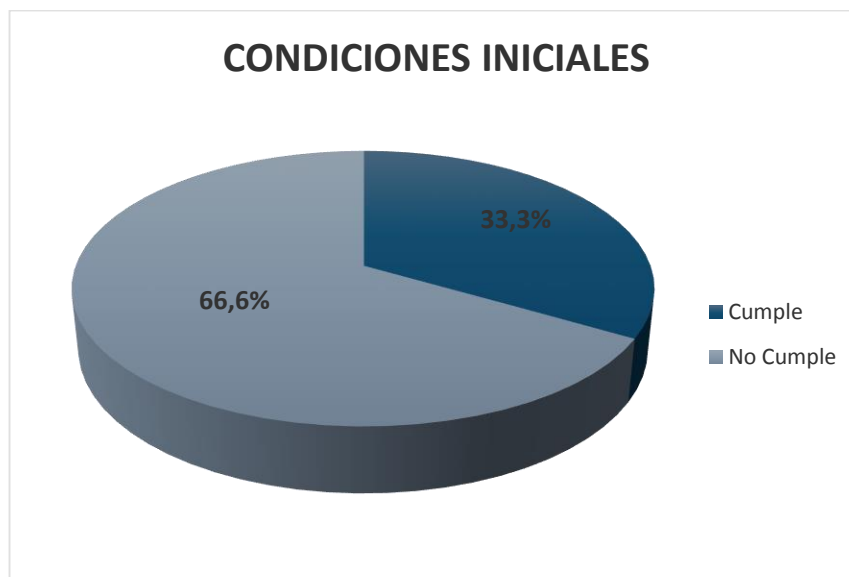


Figura 4. Evaluación condiciones iniciales del laboratorio.

Luego de haber realizado el diagnóstico sobre el estado inicial al laboratorio microbiológico de aguas Peñaflores, se evidencia en la figura 4 un bajo nivel de cumplimiento (33,3%) refiriéndose a la lista de chequeo que implementa el Instituto Nacional de Salud-INS para la evaluación de inspección y control a los laboratorios. Una de las razones, es que a pesar de que el laboratorio contaba con un programa para disposición de residuos no existían recipientes clasificados por colores para la respectiva separación de acuerdo al grado de peligrosidad. Asimismo, no se encontraban señalizadas las áreas del laboratorio, las cuales son medidas preventivas que evitan riesgos y accidentes. Dichas inconformidades encontradas son consecuencia de la inactividad del laboratorio microbiológico de aguas Peñaflores.

En busca de aplicar acciones correctivas se procedió a realizar pruebas de ambientes y superficies para establecer un rango límite de crecimiento de microorganismos; por otra parte se realizó un manual de procedimiento donde se indica el proceso de descontaminación del material biológico y el correcto lavado y desinfección de materiales. Por último, se hizo la adquisición de recipientes para la disposición de residuos sólidos (anexo 1) y con ello dar cumplimiento a la normatividad legal vigente para la protección al medio ambiente.

La siguiente figura evalúa los ítems 2.1 al 2.5 del análisis aplicado al laboratorio Peñaflo



Figura 5. Evaluación de instrumentación del laboratorio

El cumplimiento total y el cumplimiento parcial de los ítems evaluados, referentes a equipos arrojaron porcentajes de 60 y 20% respectivamente como se aprecia en la figura 5, ya que el laboratorio microbiológico de aguas Peñaflo contaba con los equipos mínimos requeridos para la realización de análisis de muestras de agua, además se hizo la adquisición de un nuevo equipo de fometría, con el que se trabajó en el proceso de validación de las técnicas microbiológicas. El porcentaje de incumplimiento hizo énfasis a los ítems relacionados con la documentación, que permiten llevar el registro de actividades, por tal razón, se diseñaron e implementaron formatos de control de factores importantes como son temperatura y humedad relativa.

La figura 6 se basó en la determinación del cumplimiento de los parámetros referentes a materiales e insumos necesarios en los laboratorios de ensayo.



Figura 6. Evaluación inicial de materiales e insumos.

En la figura 6 se evidenció un desempeño adecuado del 40% a razón de que el laboratorio dispone de la información sobre el uso adecuado de los materiales volumétricos para prevenir errores en la medición y el 40% de incumplimiento es debido a que el laboratorio no contaba con manual de los procedimientos utilizados en pruebas microbiológicas, por lo tanto fue necesario su creación, la cual no sólo sirve para la autorización por parte del Ministerio de Salud y Protección Social sino también para la futura acreditación del laboratorio.

En la figura 7 se presenta la evaluación de los ítems referentes a materiales de referencia y reactivos.



Figura 7. Evaluación de reactivos y material de referencia certificado, con que contaba inicialmente el laboratorio.

Los reactivos y medios de cultivo empleados en los laboratorios deben ser de excelente calidad, así como patrones de referencia necesarios para la trazabilidad de los resultados del método. Al realizar el diagnóstico e inventario de los reactivos, el laboratorio microbiológico de aguas Peñaflores sólo contaba con medios de cultivos caducados, por ende se hizo necesaria la adquisición de nuevos medios de cultivo junto con otros materiales fundamentales para la validación de la técnica de filtración por membrana.

De acuerdo a los análisis anteriores, se elaboró la documentación pertinente en el laboratorio, realizando un manual de procedimientos basado en el *Standard Methods*, con las metodologías empleadas para el análisis microbiológico de aguas potables y naturales con la técnica de filtración por membrana para la detección de Coliformes totales, fecales (*Escherichia coli*), usando un Agar cromogénico (Agar Chromocult) y para la detección de Heterótrofos en Agar Plate Count; tal como se muestra en el anexo 2.

Para el control de registros se elaboraron formatos de control diario, semanal y mensual, estos incluyen: Formatos de registro diario de temperatura/ humedad, formato de registro de limpieza y desinfección de superficies / ambientes, formato de limpieza de equipos, formato de esterilización de material y medios de cultivo, formato de conservación de cepas, formato de limpieza y desinfección de cada una de las áreas del laboratorio (anexo 3).

7.2. Control de ambientes y superficies.

En la tabla 5 se presenta los resultados de la evaluación de ambientes y superficies.

Tabla 5. Evaluación de ambientes y superficies en diferentes áreas del laboratorio microbiológico de aguas Peñaflor.

Ensayo	AMBIENTE UFC/ 90mm / 15'						SUPERFICIE UFC/ 100 cm ²						Prueba de esterilidad de medio de cultivo			
	Área de incubación		Área de siembra		Área de esterilización		Área de incubación			Área de siembra				Área de esterilización		
	M	MyL	M	MyL	M	MyL	M	MyL	CT/CF	M	MyL	CT/CF		M	MyL	CT/CF
ENSAYO 1 SEMANA 1	10	9	4	6	9	10	8	10	0	6	4	0	6	5	0	0
	7	6	2	3	9	8	0	0	0	6	1	0	2	0	0	
SEMANA 2 ENSAYO 2	6	0	3	3	0	1	5	1	0	0	0	0	0	2	0	0
	5	0	3	0	0	0	6	0	0	0	0	0	3	0	0	
SEMANA 3 ENSAYO 3	4	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	2	0	0	2	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	
SEMANA 4 ENSAYO 4	1	0	1	0	0	0	3	2	0	0	0	0	0	1	0	0
	0	0	1	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	
SEMANA 5 ENSAYO 5	1	0	0	0	2	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
SEMANA 6 ENSAYO 6	2	0	2	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2	0	0	0
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
SEMANA 7 ENSAYO 7	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
SEMANA 8 ENSAYO 8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

M: mesófilos **MyL:** mohos y levaduras **CT:** Coliformes totales **CF:** Coliformes fecales

Fuente: Autor

Los análisis se realizaron durante dos meses con la finalidad de establecer un rango máximo para aerobios mesófilos, mohos y levaduras en el caso de evaluación de ambientes junto con el análisis de Coliformes para la evaluación de superficies. Con lo anterior se determinó la eficiencia del desinfectante empleado (Hipoclorito de sodio). En los recuentos obtenidos de colonias (UFC) en los Agares Plate Count, Sabouraud y Chromocult tanto en la evaluación de ambientes como de superficies se realizó análisis a nivel microscópico mediante la técnica de tinción de Gram,

observándose cocos y bacilos Gram positivos así como levaduras y mohos del género *Penicillium spp.*, lo que descarta la posibilidad de contaminación durante el proceso de filtrado de las muestras de agua inoculadas con las cepas certificadas, dichas morfologías pueden ser observadas en el anexo 6.

Los resultados de la tabla 5, indican una carga baja de microorganismos al finalizar el período de tiempo evaluado producto de un adecuado proceso de limpieza y desinfección del laboratorio realizado antes y después de trabajar en la validación, además se empleó UV por periodos de 1 hora después de usar la cabina de siembra. Por lo tanto el rango máximo fue establecido de acuerdo a los recuentos iniciales obtenidos; siendo de 10 UFC para aerobios mesófilos y hongos en ambientes y 0 UFC para Coliformes, Aerobios mesófilos y hongos en superficies.

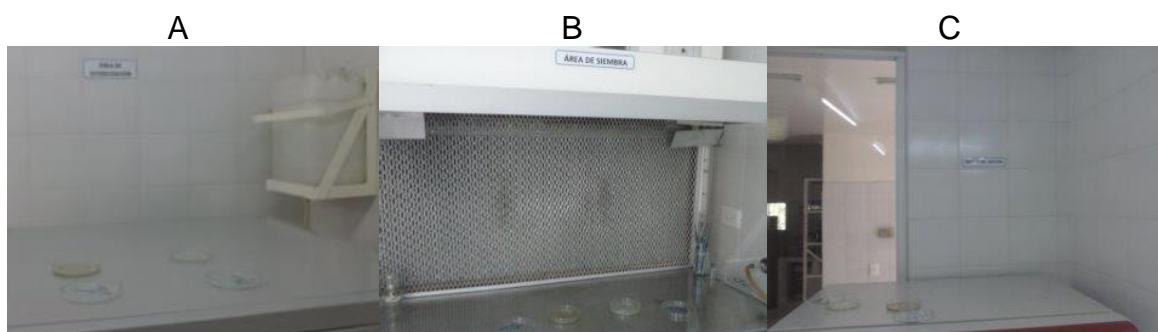


Figura 8. Evaluación de ambientes por la técnica de sedimentación empleando Agar Sabouraud + 4% glucosa y Agar Plate Count. (A) Área de incubación (B) área de siembra (C) área de incubación.

La figura 8 se observa cada una de las áreas evaluadas para el control de ambientes con la técnica de sedimentación realizada en el laboratorio microbiológico de aguas Peñaflo. Cabe señalar que luego de haber determinado el rango límite, se comenzó a emplear la rotación de desinfectantes para evitar la resistencia de los microorganismos, utilizando Durabacter TC-31 a base de amonio cuaternario de quinta generación, lo que ha disminuido aún más la contaminación ambiental del laboratorio microbiológico de aguas Peñaflo.

7.3. Cepas de referencia

En la validación de la técnica de filtración por membrana se utilizaron cepas de referencia certificadas: *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352 y *Escherichia coli* ATCC 8739. Su reactivación se efectuó paso a paso según lo estipulado por la casa comercial y luego se conservaron en Cryobank (utilizados para el almacenamiento y reactivación de cepas bacterianas) como se observa en el anexo 7. El crecimiento de ambos microorganismos sembrados en los medios de cultivo (Chromocult y Plate Count) fueron los esperados, debido a que su pureza y viabilidad se mantuvieron estables durante el proceso de validación, dicha pureza se detalla más adelante en la tabla 7, en la imagen microscópica de ambas bacterias.

7.4. Escala McFarland

La preparación de los inóculos bacterianos se realizó de forma visual, tomando como referencia el tubo de concentración 0,5 de la escala McFarland, en el cual se asume que la turbiedad de la concentración química es equivalente a una concentración bacteriana de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (McFarland, 1907). Adicionalmente, se empleó un turbidímetro que da valores más exactos expresados en unidades NTU (unidades nefelométricas de turbiedad).



Figura 9. Patrón químico con $\text{BaCl}_2 + \text{H}_2\text{SO}_4$: **(A)** Para medir espectrofotometría **(B)** Para medir turbiedad.

La tabla 6 evidencia la comparación entre la lectura de absorbancia teórica del tubo de concentración 0,5 el cual fue usado como referente y los valores obtenidos de cada microorganismo (absorbancia experimental a una longitud de onda 625 nm). Asimismo, se hace una correlación entre los valores obtenidos de turbidez experimental.

Tabla 6. Absorbancias teóricas Vs Absorbancias experimentales bacterianas y valores de turbidez experimental.

ABSORBANCIA TEÓRICA 625nm <i>Klebsiella pneumoniae</i>	ABSORBANCIA EXPERIMENTAL BACTERIANA K	ABSORBANCIA TEÓRICA 625nm <i>E. coli</i>	ABSORBANCIA EXPERIMENTAL BACTERIANA E	TURBIDEZ EXPERIMENTAL	
				K	E
0,078	0,078	0,068	0,066	Rango: 6.0- 7.0 NTU	Rango: 6.5-7.5 NTU
	0,079		0,069		
	0,080		0,069		
	0,079		0,067		
	0,079		0,066		
	0,080		0,067		
	0,079		0,068		
	0,080		0,066		
	0,078		0,069		
	0,077		0,068		
	0,079		0,068		
	Rango : 0,078-0,080		Rango 0,066- 0,069		

K: *Klebsiella pneumoniae* E: *E. coli*

Fuente: Autor

Con los resultados de las absorbancias de las suspensiones bacterianas experimentales se pudo comprobar que la concentración de partida era aproximadamente de $1,5 \cdot 10^8$ UFC/mL, puesto que los valores de los recuentos en placa, concuerdan con los recuentos teóricos tal y como se muestran en la tabla 8 que se encuentra ubicada más adelante.

7.5. Control de esterilidad

7.5.1. Prueba para los medios de cultivo

Para ello se realizaron controles una vez por semana, tomando al azar cajas con Agar PC, CHR y SB preparados en el laboratorio, dichos resultados fueron satisfactorios ya que no hubo crecimiento de microorganismos de algún género ni presencia de turbiedad en el medio líquido empleado para la evaluación de superficies (Agua peptonada bufferada preparada al 1%); pasado el tiempo de incubación de 24 a 48 horas para presenciar crecimiento bacteriano ni después de 5 días para evaluar el crecimiento de hongos.

El control de calidad en la preparación y evaluación de medios de cultivo se considera parte fundamental de las buenas prácticas de laboratorio, a su vez es considerado uno de los puntos críticos de control del cual depende la seguridad y confiabilidad de los resultados emitidos en cualquier laboratorio de análisis microbiológico (Páez, 2008).

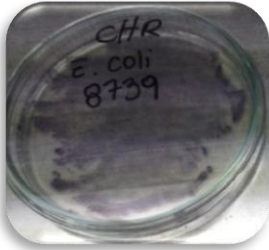
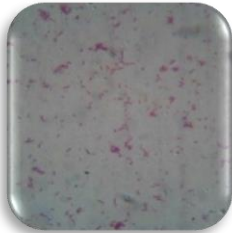


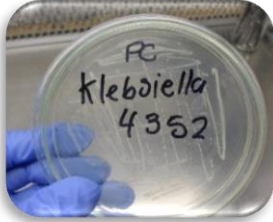
7.5.2. Prueba de esterilización del autoclave

Los resultados obtenidos fueron satisfactorios pues la cinta esterilométrica **3M** cambió de color una vez finalizado el proceso de esterilización, lo cual es una confirmación de que el proceso de esterilización fue el adecuado y que las temperaturas y tiempos de esterilización se aplicaron correctamente. Además, los controles de esterilidad realizados a los diferentes medios de cultivo comprueban que la autoclave eliminó efectivamente los microorganismos.

7.5.3. Prueba de promoción de crecimiento

En la tabla 7 se presenta la descripción morfológica de los microorganismos evaluados durante la validación.

Tabla 7. Características morfológicas de las cepas de trabajo.

MEDIO	MICROORGANISMO	CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS (Merck)	CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS	CONFIRMACIÓN (Merck)
AGAR CHROMO CULT	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	 <p>Colonias pequeñas con pigmentación morada debido a que escinde el sustrato X-glucoronido y salmón GAL.</p>	 <p>Se observan bacilos Gram negativos, para ambos microorganismos, lo que corrobora sobre la pureza de las cepas.</p>	 <p><i>Escherichia coli</i> es capaz de producir indol a partir de triptófano, y la confirmación se da con la adición del reactivo de Kovac's, en el cual las colonias toman una coloración rojiza, mientras que algunas especies del género <i>Klebsiella spp.</i>, no lo producen.</p>
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 4352	 <p>Colonias pequeñas con pigmentación rojiza, debido a que sólo escinde el sustrato salmón GAL.</p>		
AGAR PLATE COUNT		 <p>Colonias pequeñas de color crema, redondas y bordes regulares.</p>		

El resultado de las siembras en Agar Chromocult y Plate Count concuerda con las características típicas tanto a nivel macroscópico como con la identificación de las colonias a nivel microscópico, al aplicar tinción de Gram. Además, la adición del reactivo de KOVAC'S permitió observar a nivel bioquímico la degradación aminoácida reflejada en la coloración rojiza sobre aquellas colonias que son INDOL (+) como lo es *Escherichia coli*.



Figura 10. Recuento microbiano en Agar Chromocult y Plate Count. (A) *Klebsiella pneumoniae* (B) *Escherichia coli* (C) Heterótrofos

7.6. Evaluación de los parámetros con diferentes muestras de agua

En la tabla 8 se muestran los resultados de las tres últimas diluciones para la detección de Coliformes totales, *E. coli* y Heterotrofos en agua potable y agua destilada estéril.

Tabla 8. Resultados de los recuentos de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352 y *Escherichia coli* ATCC 8739 con la técnica de filtración por membrana.

RECuento	DILUCIONES								
	K.			E.			H.		
	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸
1	155	17	2	167	12	2	162	15	1
2	153	15	1	156	17	1	156	16	1
3	154	13	1	170	19	4	158	13	0
4	147	14	0	168	16	0	155	15	2
5	154	15	1	164	17	1	162	17	4
6	150	15	1	171	19	3	163	17	3
7	152	16	2	160	15	1	154	16	0
8	146	13	2	154	18	2	157	15	1
9	147	14	1	156	17	4	160	16	2
10	155	14	1	158	15	1	155	15	0
PROM	151,3	14,6	1,2	162,4	16,5	1,9	158,2	15,5	1,4

K. *Klebsiella pneumoniae* **E.** *Escherichia coli* **H.** Heterótrofos

Fuente: Autor

Los análisis de las muestras inoculadas artificialmente en agua potable y agua destilada desionizada estéril con las cepas certificadas describen el buen desempeño de la técnica empleada, debido a que se siguieron los lineamientos del *Standard Methods*.

7.7. Datos estadísticos experimentales

En la tabla 9 se muestra los límites aceptables para los coeficientes de variación según Horwitz lo que permite determinar la precisión del método.

Tabla 9: Porcentaje de coeficiente de variación de acuerdo a la ecuación de Horwitz

(%) DE ANALITO UNIDADES	FRACCIÓN DEL ANALITO	UNIDADES	HORWITZ%
100	1	100%	2
10	10 ⁻¹	10%	2.8
1	10 ⁻²	1%	4
0.1	10 ⁻²	0.1%	5.6
0.01	10 ⁻⁴	100 ppm	8
0.001	10 ⁻⁵	10 ppm	11
0.0001	10 ⁻⁶	1 ppm	16
0.00001	10 ⁻⁷	100 ppb	23
0.0000001	10 ⁻⁸	10 ppb	32

Fuente: Horwitz, 1982

Se empleó el criterio de precisión aceptable, determinado por Horwitz en 1982 y se aplicó para la técnica de filtración por membrana, tomando como referente los coeficientes de variación señalados en la tabla 9. Sin embargo se tuvo en cuenta que ciertos protocolos de validación no recomiendan el uso de muestras con un número tan bajo de bacterias para evitar fundamentar las interpretaciones en criterios de ausencia o presencia (Redondo *et al.*, 2011). Por tanto, la tabla 10 presenta solamente los valores de los recuentos de las diluciones (10^{-6}) y (10^{-7}).

Tabla 10. Desviación estándar, coeficiente de variación y porcentaje de recuperación de cada parámetro evaluado usando las cepas de trabajo.

Dilución	Log ₁₀ teórico	Media de los Recuentos	Log ₁₀ experimental	Desviación Estándar	% Coeficiente De Variación	% Recuperación	Criterio de aceptación según Horwitz (% C.V)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 4352							
10^{-6}	2,176	151,3	2,179	0,010	0,467	100	16
10^{-7}	1,176	14,6	1,162	0,037	3,194	98,8	23
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739							
10^{-6}	2,176	162,4	2,210	0,017	0,769	101	16
10^{-7}	1,176	16,5	1,213	0,059	4,915	103	23
HETERÓTROFOS <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 4352							
10^{-6}	2,176	158,2	2,199	0,009	0,414	101	16
10^{-7}	1,176	15,5	1,189	0,034	2,861	101	23

C.V: coeficiente de variación

Fuente: Autor

Los resultados obtenidos de los logaritmos de los recuentos experimentales para la evaluación de Coliformes y Heterótrofos en aguas potables y naturales no sobrepasaron el criterio de aceptación según Horwitz, es decir, el 16% o 23% del coeficiente de variación, por lo tanto, se dedujo que la precisión entre los recuentos realizados fueron eficientes. A su vez, confirmó que los valores de absorbancia de las concentraciones de las suspensiones bacterianas se encontraban próximos a $1,5 * 10^8$ UFC/mL.

Por otra parte, al dividir el logaritmo de los recuentos experimentales sobre los logaritmos teóricos y posteriormente multiplicar por cien, se obtiene el porcentaje de recuperación. Asimismo, se logró observar la buena recuperabilidad de la cepa de ***Escherichia coli* ATCC 8739** y ***Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352** en los medios de cultivo empleados (Chromocult y Plate Count), pues los valores se encontraron en un rango del 98 al 103%, obteniendo un porcentaje del 98 al 100% en el recuento de Coliformes totales, un 101% para Heterótrofos y un 101 a 103% con ***Escherichia coli* ATCC 8739**.

7.7.1. Límite de detección

En los datos experimentales para la detección de Coliformes y Heterótrofos empleando agua potable, agua destilada estéril y las cepas de referencia *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352 y *Escherichia coli* ATCC 8739, se obtuvieron recuentos entre 0 y 4 UFC/100mL a partir de la última dilución (10^{-8}), con la técnica de filtración por membrana, tal como se demuestra en la tabla 8, dando como resultado un valor mínimo detectable de 1 UFC (unidad formadora de colonia), atendiendo a una de las ventajas de la técnica en lo referente al alto grado de sensibilidad o detección microbiana.

7.7.2. Rango de trabajo

El laboratorio microbiológico de aguas Peñaflores no disponía de un rango límite de trabajo para la implementación de la técnica de filtración por membrana por lo tanto se estableció un rango de 20-170 UFC/mL; teniendo en cuenta que a valores inferiores no es confiable emitir un resultado cuantitativo, por lo que su evaluación sería mejor realizarla cualitativamente por el método de (presencia/ausencia). Por el contrario si los recuentos son muy elevados tienden a presentar un crecimiento confluyente sobre la membrana, lo cual no permite diferenciar la separación entre las colonias. El *Standard Methods*, tiene estimado un rango de 20 – 200 UFC/mL, por consiguiente los valores se encuentran dentro de sus lineamientos.

7.7.3. Repetibilidad y reproducibilidad

Los ensayos de repetibilidad se realizaron por quintuple y los de reproducibilidad por triplicado, empleando la cepa *Escherichia coli* ATCC 8739 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352. La repetibilidad se realizó con un analista, mientras que la reproducibilidad fue evaluada con dos analistas.

La repetibilidad es la medida de precisión del método cuando este se realiza por el mismo analista, el mismo día, mismos reactivos y mismo instrumento, y la reproducibilidad se mide cuando el ensayo se realiza por diferentes analistas, diferentes días y diferentes instrumentos, por lo tanto estos parámetros nos dan información acerca de la precisión del método (Carrillo, 2008).

La prueba de repetibilidad se realizó con dos concentraciones: una de 50 UFC y otra de 80 UFC. En los recuentos experimentales se obtuvieron coeficientes de variación inferiores al 16% y 23% según el criterio de aceptación de Horwitz, logrando establecer que la técnica de filtración por membrana es repetible (datos no mostrados).

En la tabla 11 figuran los resultados de los recuentos y análisis estadísticos luego de la realización de la prueba de reproducibilidad.

Tabla 11. Comparación de los resultados obtenidos por diferentes analistas en el proceso de filtración por membrana.

N° Reproducibilidad	Analista 1						Analista 2					
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 4352			<i>E. coli</i> ATCC 8739			<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 4352			<i>E. coli</i> ATCC 8739		
	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸
1	143	14	1	160	16	2	156	14	1	170	18	1
2	145	13	2	155	15	2	142	11	0	167	17	2
3	153	13	0	168	16	1	154	12	2	162	17	0
Promedio	147	13,3	1	161	15,6	1,66	150,6	12,3	1	166,3	17,3	1
Promedio log ₁₀	2,167	1,124	0,10	2,206	1,194	0,20	2,177	1,088	0,1 0	2,220	1,238	0
Log ₁₀ Teórico	2,176	1,176	0	2,176	1,176	0	2,176	1,176	0	2,176	1,176	0
Desviación estándar	0,015	0,018	---	0,017	0,016	---	0,022	0,053	---	0,010	0,014	---
Coefficiente de variación	0,715	1,652	---	0,798	1,354	---	1,016	4,870	---	0,476	1,156	---

Fuente: Autor

Los resultados de la tabla 11 corresponden a los recuentos hallados en la prueba de reproducibilidad, al comparar los logaritmos de los ambos microorganismos empleados, en el cual se observó un eminente grado de precisión dentro y entre los analistas ya que las desviaciones estándar son relativamente bajas y confrontando los coeficientes de variación, son inferiores al criterio de aceptación según Horwitz (16% y 23%).

Sin embargo si se detallan los recuentos de la dilución 10⁻⁷ del analista 2, se observa que este presenta el valor más alto en el porcentaje del coeficiente de variación, lo que indica que hay una variabilidad de los datos con relación al valor real, debido a que los microorganismos no son iones; forman suspensiones y no soluciones y estas suspensiones tienen un alto grado de heterogeneidad y además *Klebsiella pneumoniae* es una bacteria que presenta cápsula lo que hace que se dificulte la separación entre colonias y por lo tanto no formará una suspensión homogénea en el agua (Redondo, 2011), aun así es inferior al criterio de aceptación según Horwitz, por lo tanto, se confirma que la técnica de filtración por membrana no se ve afectada siempre y cuando los analistas realicen los ensayos de acuerdo con los lineamientos que se estipularon para el procedimiento de filtrado y sembrado, con esto se demostró que el método no sólo es repetible sino también reproducible.

8. CONCLUSIONES

Con la elaboración de la documentación del laboratorio microbiológico de aguas Peñaflores, con respecto al manual de procedimientos, formatos de control de equipos, limpieza y desinfección de áreas, control de condiciones ambientales, entre otras, se logró mejorar el cumplimiento de los requisitos para la autorización y acreditación del laboratorio.

A través de la evaluación de ambientes y superficies del laboratorio microbiológico de aguas Peñaflores se logró establecer un rango permisible de microorganismos en el laboratorio, siendo de 10 UFC/90mm/15' para Aerobios Mesófilos, Mohos y Levaduras en ambientes y 0 UFC/100cm² sobre las superficies. Los resultados obtenidos durante el tiempo de evaluación permitieron evidenciar la efectividad del desinfectante empleado, disminuyendo considerablemente la cantidad de microorganismos contenidos en el ambiente y sobre las superficies de mesones y equipos empleados, evitando la contaminación y alteración de los resultados en los recuentos durante el proceso de validación.

La técnica de filtración por membrana demostró ser una técnica fácil, rápida y confiable para la obtención de los resultados empleando el Agar Chromocult, en el cual se obtuvieron recuentos de colonias en menos tiempo, gracias a la presencia de enzimas propias y específicas que exhibe cada uno de los microorganismos evaluados.

La implementación de la técnica de filtración por membrana realizada en el laboratorio microbiológico de aguas Peñaflores es repetible y reproducible, al evaluar sus desviaciones estándar, siendo estas inferiores a 1 y los coeficientes de variación inferiores al 5%, concluyendo así que, los resultados no van a fluctuar significativamente por el cambio en el analista.

El límite de detección para la técnica de filtración por membrana fue establecido a partir del valor mínimo detectable siendo de 1 UFC, determinada a partir de la dilución más baja (10^{-8}) para ***E. coli*** y ***Klebsiella pneumoniae*** en las muestras de agua.

9. RECOMENDACIONES

- ✚ Se recomienda actualizar constantemente la documentación del laboratorio y que se asigne un lugar de almacenamiento, para facilitar su consulta a personal autorizado.
- ✚ Se sugiere dar continuidad en la elaboración de documentos faltantes para la implementación de un sistema de gestión de calidad, necesario para el préstamo de servicio de análisis de aguas en el laboratorio.
- ✚ Para próximos estudios de validación de la técnica de filtración por membrana para la detección de Coliformes y Heterótrofos en aguas potables y naturales, se deben tener en cuenta las pruebas de selectividad y productividad sobre los medios de cultivo evaluados, para determinar la eficiencia con la que el medio de cultivo recupera una cepa.
- ✚ Se recomienda siempre trabajar con materiales, medios de cultivo y patrones de referencia certificados, para garantizar la confiabilidad y veracidad de los resultados de cada ensayo.

10. GLOSARIO

- ✚ **CALIDAD:** Es la totalidad de aspectos y características de un producto o servicio que permiten satisfacer necesidades de un cliente o quien lo necesite.
- ✚ **MANUAL DE CALIDAD:** Documento que establece las políticas de calidad y describe al sistema de calidad de un organismo.
- ✚ **MATERIAL DE REFERENCIA CERTIFICADO:** Material o sustancia en la cual, uno o más valores de sus propiedades son suficientemente homogéneos y bien definidos, para ser utilizados para la calibración de un instrumento, la evaluación de un método de medición o para asignar valores a los materiales que viene acompañado de un certificado, con una o más propiedades cuyos valores están certificados por un procedimiento que establece su trazabilidad.
- ✚ **VALIDACIÓN** Acción de probar que un procedimiento, proceso, sistema, equipo o método usado en la producción o control de un producto funciona de acuerdo a lo esperado y logra el resultado propuesto.
- ✚ **FILTRACIÓN POR MEMBRANA:** Técnica que consiste en separar, mediante una superficie permeable (filtro), los microorganismos de los fluidos en cuyo seno están suspendidos.
- ✚ **AGUA POTABLE:** Es aquella que por reunir los requisitos organolépticos, físicos, químicos y microbiológicos, puede ser consumida por la población humana sin producir efectos adversos a su salud.
- ✚ **EXAMEN MICROBIOLÓGICO DE AGUA:** Son aquellas pruebas de laboratorio que se efectúan a una muestra para determinar la presencia o ausencia, tipo y cantidad de microorganismos.
- ✚ **MEDIOS DE CULTIVO:** Es el conjunto de nutrientes y sustratos que permiten el crecimiento, la multiplicación y el aislamiento de las diferentes especies bacterianas para llegar a su identificación
- ✚ **UFC:** Unidad formadora de colonias.
- ✚ **ATCC:** American type culture collection

11. BIBLIOGRAFÍA

ACUÑA, H., MARTINEZ, N. Implementación del sistema de gestión de calidad en las pruebas realizadas en el laboratorio de análisis petrofísico con base en la norma NTC ISO 17025: 2005. Bucaramanga. 2009. Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ingenierías Físicoquímicas.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA), AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION (AWWA) & WATER ENVIRONMENT FEDERATION (WEF): Standard methods for the examination of water and wastewater. 21st Edición. 2005.

AURAZO, M. Manual para análisis básicos de calidad del agua de bebida. Organización Panamericana de la Salud. Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente. Lima. 2004. Disponible en: http://www.bvsde.paho.org/CD-GDWQ/Biblioteca/Manuales_Guias_LibrosDW/manual%20 analisis%20basicos%20CA.pdf

BARTRAM, J., COTRUVO, J., EXNER, M., FRICKER, C., GLASMACHER, A. Heterotrophic plate counts and drinking-water safety: The significance of HPCs for water quality and the human health. WHO. ISBN 92 4 156226 9. 2003. Disponible en: http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/HPCFull.pdf?ua=1

CARRILLO, E., LOZANO, A. Validación del método de detección de Coliformes totales y fecales en agua potable utilizando Agar Chromocult. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá. 2008. Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis203.pdf>

FIGUERAS, M., BORREGO, J. New Perspectives in Monitoring Drinking Water Microbial Quality. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. Review. 2010, 7(12), 4179-4202. Doi: 10.3390/ijerph7124179. Disponible en: <http://www.mdpi.com/1660-4601/7/12/4179/htm>

GACETA, Número 100. Universidad Veracruzana. Dirección de Comunicación Social de la UV. 2008

GARCÍA, C. Revisión y actualización de los procedimientos documentados del laboratorio de microbiología de alimentos de la Pontificia Universidad Javeriana y elaboración de manual de manejo de equipos. Pontificia Universidad Javeriana. Tad de ciencias. Bogotá, D.C. 2006. Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis269.pdf>

HORWITZ, J. Evaluation of analytical methods used for regulation of foods and drugs. *Analytical Chemistry*, 1982.

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN. NORMA TÉCNICA COLOMBIANA NTC 4772. Calidad del agua. Detección y recuento de *Escherichia coli* y de bacterias Coliformes. Parte 1: método de filtración por membrana. Bogotá, D.C. ICONTEC. 2008

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN. NORMA TÉCNICA COLOMBIANA NTC-ISO/IEC 17025. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración. Bogotá. ICONTEC. 2005

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN. Sistema de gestión de la calidad fundamentos y vocabulario. NTC-ISO 9001. Bogotá D.C.

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD. Programa de vigilancia por laboratorio de la calidad de agua para consumo humano. ISBN: 978-958-13-0150-8. Bogotá D.C. 2011. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/sivicap/Normatividad/2011%20Manual%20 analisis%20fisico%20quimico%20aguas.pdf>

ISIDRO, S. Validación secundaria de la técnica de filtración por membrana para la detección de Coliformes totales, *E. coli* y *P. aeruginosa* en aguas recreativas. Universidad de Pamplona. Facultad de Ciencias Básicas. Pamplona. 2014

LARREA, J., ROJAS M., ROMEU B., ROJAS N., HEYDRICH M. Bacterias indicadoras de contaminación fecal en la evaluación de la calidad de las aguas: revisión de la literatura. Revista CENIC ciencias biológicas. 2013. Vol. 44: 3. ISSN: 2221-2450. Disponible en: <http://revista.cnic.edu.cu/revistaCB/articulos/bacterias-indicadoras-de-contaminaci%C3%B3n-fecal-en-la-evaluaci%C3%B3n-de-la-calidad-de-las-aguas>

McFARLAND, J. Nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. 1907. *Jama* 190714:1176-1178

MARTINEZ, M. Tecnologías para el uso sostenible del agua. Asociación mundial para el agua. Capítulo Centroamérica organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura. Tegucigalpa, Honduras, 2013. ISBN 978-92-5-307931-5. Disponible en: http://www.gwp.org/Global/GWP-CAM_Files/Tecnologias%20para%20el%20uso%20sostenible%20del%20agua.pdf

MERCK® Millipore Corporation. MEDIOS DE CULTIVO. <http://www.merckmillipore.com/CO/es>

MINISTERIO DE SALUD Y PROTECCIÓN SOCIAL. INSTITUTO NACIONAL DE SALUD (MPS). Lineamientos técnicos para la estandarización y validación de métodos de ensayo. 2014. Disponible en: <http://www.saludcapital.gov.co/CTDLab/Publicaciones/2015/Lineamiento%20montaje%20estandarizacion%20y%20validacion.pdf>

MINISTERIO DE SALUD Y PROTECCIÓN SOCIAL. INSTITUTO NACIONAL DE SALUD (MPS) Enfermedades vehiculizadas por agua-EVA e índice de riesgo de la calidad en Colombia-IRCA, 2008 - 2013. Bogotá, D.C., Colombia. 2014. ISBN: 978-958-13-0174-4. Disponible en: http://www.ins.gov.co/sivicap/Normatividad/2014%20Enfermedades%20Vehiculizadas%20por%20Agua%202008-2013.pdf?Mobile=1&Source=%2Fsivicap%2F_layouts%2Fmobile%2Fview.aspx%3FList%3Ddc462e4b-5de8-4a2f-be3a-08ad1c837db7%26View%3D0ac5f5c5-4988-442d-bc0e-2c07af4f66a5%26CurrentPage%3D1

MINISTERIO DE SALUD Y PROTECCIÓN SOCIAL. Instituto Nacional de Salud. Enfermedades vehiculizadas por agua-EVA e índice de riesgo de la calidad en Colombia-IRCA, 2014. Bogotá, D.C., Colombia. 2015. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/sivicap/Normatividad/2015%20Enfermedades%20Vehiculizadas%20por%20Agua%202014.pdf>

MINISTERIO DE SALUD Y PROTECCIÓN SOCIAL. Instituto Nacional de Salud. BES- Boletín Epidemiológico Semanal. Semana epidemiológica número 06 de 2016 (07 feb. al 13 feb.). ISSN 2357-6189. 2016. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/boletin-epidemiologico/Boletn%20Epidemiologico/2016%20Boletin%20epidemiologico%20semana%206.pdf>

MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA (MSP). DECRETO 475. 16 de MARZO de 1998. Por el cual se expiden normas técnicas de calidad del agua potable.

MINISTERIO DE LA PROTECCION SOCIAL, MINISTERIO DE AMBIENTE, VIVIENDA Y DESARROLLO TERRIOTRIAL. RESOLUCIÓN 4716. 18 NOVIEMBRE 2010. Por medio de la cual se reglamenta el parágrafo del artículo 15 del Decreto 1575 de 2007.

MINISTERIO DE LA PROTECCIÓN SOCIAL. DECRETO 1575. 9 MAYO 2007. Por el cual se establece el Sistema para la Protección y Control de la Calidad del Agua para Consumo Humano.

MINISTERIO DE LA PROTECCIÓN SOCIAL MINISTERIO DE AMBIENTE, VIVIENDA Y DESARROLLO TERRITORIAL. RESOLUCIÓN 2115. 22 JUNIO 2007. Ministerio de la protección social ministerio de ambiente, vivienda y desarrollo territorial.

OFICINA DE ACREDITACION GUATEMALA.C.A. OGA-GEC-016. Política de Selección y Validación de Métodos de Ensayo. Guatemala. 2007.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SALUD (OMS). Guías para la calidad del agua potable. Tercera Edición Vol. 1. Organización Mundial de la Salud. 2006. ISBN 92 4 154696 4. Disponible en: http://apps.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3_es_full_lowsres.pdf?ua=1

ORTIZ, J. Documentación del sistema de gestión de calidad de la empresa MONTEVITAL LTDA según NTC-ISO 9001:2008. Universidad Tecnológica De Pereira. Facultad de Tecnologías. Programa De Química Industrial. Pereira. 2010. Disponible en: <http://repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/handle/11059/2054/658562077ds.pdf?sequence=1>

OSPINO, G. Filtración por membrana para la detección de Coliformes totales y *Escherichia coli* en aguas. Universidad de Pamplona. Facultad de Ciencias Básicas. Pamplona. 2013.

PÁEZ, L. Validación Secundaria del método de filtración por membrana para la detección de Coliformes totales y *Escherichia coli* en muestras de aguas para consumo humano analizadas en el laboratorio de salud pública del Huila. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá. 2008. Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis221.pdf>

PEÑA, M. Características macroscópicas de bacterias. Universidad del Magdalena. Santa Marta.

PULLÉS, R. Microorganismos indicadores de la calidad del agua potable en Cuba Revista CENIC. Ciencias Biológicas, Centro Nacional de Investigaciones Científicas Ciudad de La Habana, Cuba. Vol. 45, núm. 1, 2014. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181230079005>.

REAL ACADEMIA ESPAÑOLA-RAE. 2010 Laboratorio. Disponible en: http://dle.rae.es/?id=MjESnb2_

REAL DECRETO 140. Criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano. BOE núm. 45. 2003. Disponible en: <https://www.boe.es/buscar/pdf/2003/BOE-A-2003-3596-consolidado.pdf>

REDONDO, M., ARIAS, M. Comparación de métodos para el análisis de Coliformes totales y fecales en muestras de agua mediante la técnica de Número Más Probable (NMP). Laboratorio de Microbiología de Alimentos y Aguas. Facultad de Microbiología. Universidad de Costa Rica. San José. Vol. 3(2), 2011. (ISSN: 1659-4266)

RODRÍGUEZ, J. Documentación de los requisitos de equipos de la norma NTC-ISO/IEC 17025: 2005 para el laboratorio EMICAL LTDA. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. 2008. Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis131.pdf>

ROMERO, J. Calidad del agua. (2). Escuela Colombiana de Ingeniería. Bogotá. ISBN 958-8060-53-2. 2009.

RUEDA, E. Manual de buenas prácticas de laboratorio para el registro ante el ICA. 2007.

SCHARLAB. CONTROL MICROBIOLÓGICO AMBIENTAL Y DE SUPERFICIES. Disponible en: <http://www.cienytech.com/catalogos/Microbiologia/Controlsup.pdf>

UNITED NATIONS EDUCATIONAL, SCIENTIFIC AND CULTURAL ORGANIZATION (UNESCO). WATER FOR PEOPLE, WATER FOR LIFE. Informe de las Naciones Unidas sobre el Desarrollo de los Recursos Hídricos en el Mundo. Paris. 2003. Disponible en: <http://www.un.org/esa/sustdev/sdissues/water/WWDR-spanish-129556s.pdf>

YAÑEZ, M., ACEVEDO, K. EL ACCESO AL AGUA PARA CONSUMO HUMANO EN COLOMBIA. Revista de Economía Institucional. vol.15: 29. 2013. pp. 125-148. Disponible en: <http://www.economiainstitucional.com/esp/vinculos/pdf/No29/myanez29.pdf>

12. ANEXOS

1. MARCACIÓN DE ÁREAS DEL LABORATORIO

ÁREA DE RESIDUOS



ÁREA DE ESTERILIZACIÓN



ÁREA DE SIEMBRA



ÁREA DE INCUBACIÓN



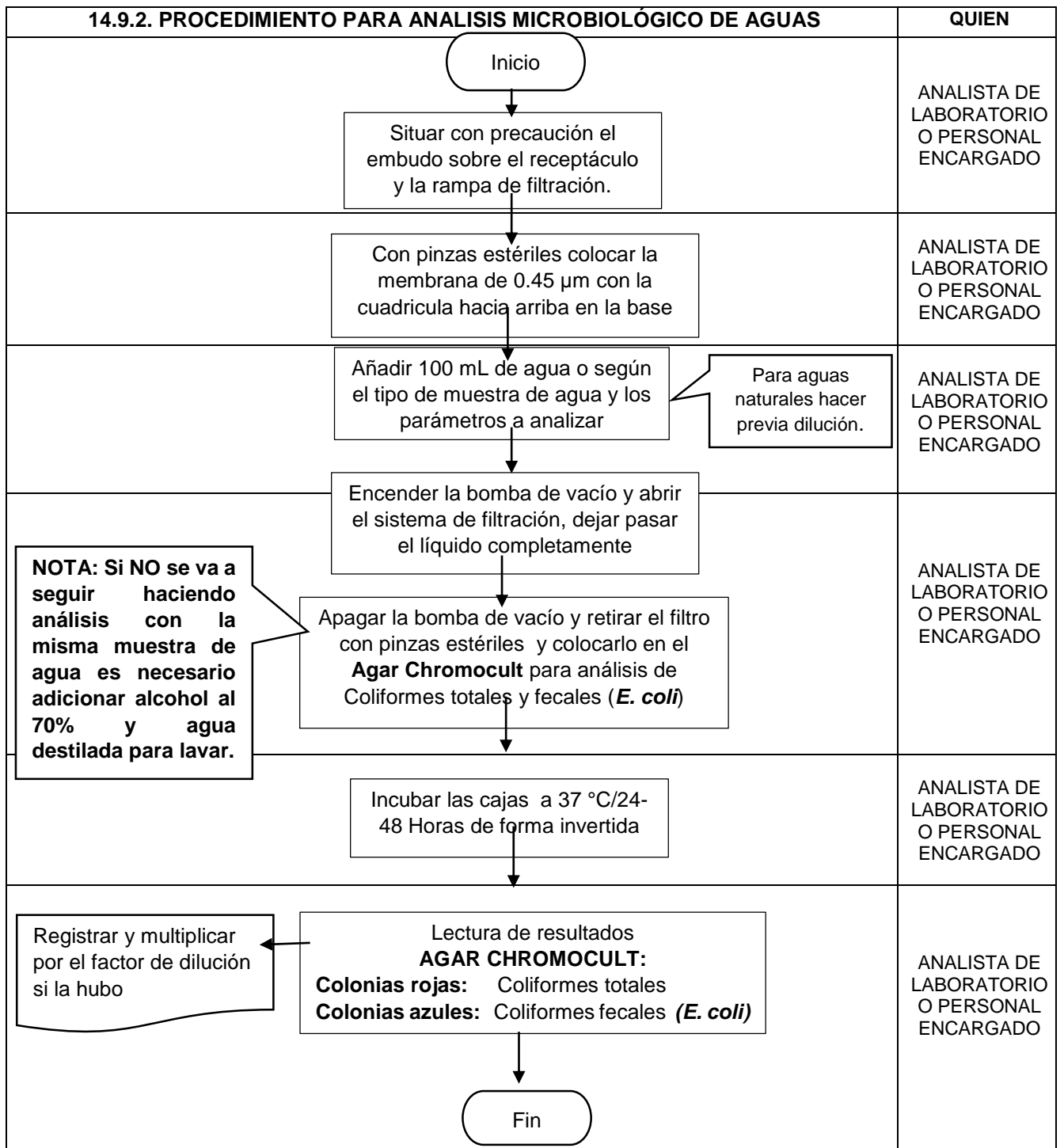
ÁREA DE MICROSCOPIA



ENTRADA AL LABORATORIO

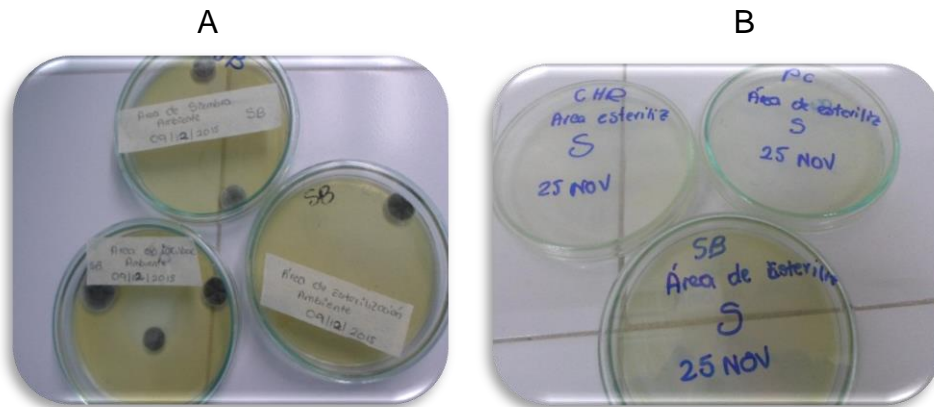


2. PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACION DE COLIFORMES

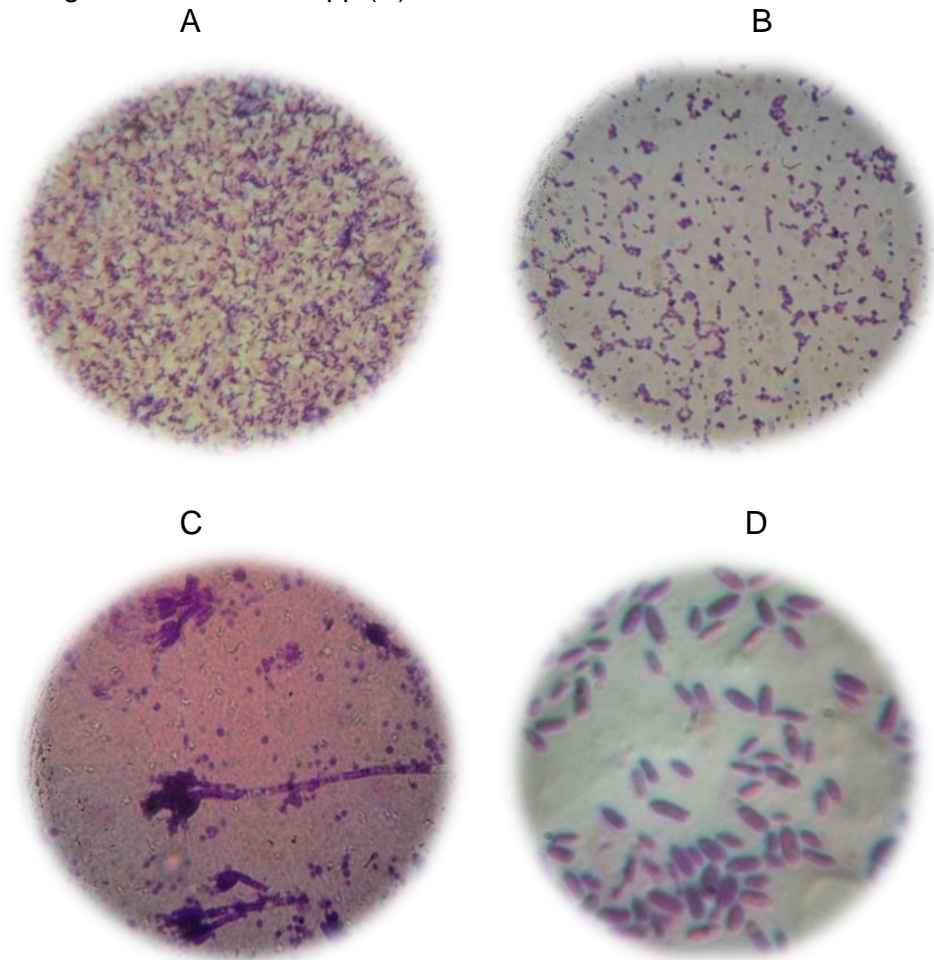


6. MORFOLOGÍA

RESULTADOS DE MACROSCOPIA: (A) Prueba de ambientes (B) Prueba de superficies



RESULTADOS DE MICROSCOPIA: (A) Bacilos Gram positivos (B) Cocos Gram positivos (C) Moho del género *Penicillium* spp (D) Levaduras



7. ACTIVACIÓN DE CEPAS CERTIFICADAS Y CRIOPRESERVACIÓN (CRYOBANK)

