

**VALIDACIÓN SECUNDARIA DEL MÉTODO DE FILTRACIÓN POR MEMBRANA  
PARA LA DETECCIÓN DE COLIFORMES TOTALES, *Escherichia coli* Y  
*Pseudomonas aeruginosa* EN AGUAS EMPLEADAS EN PASTEURIZADORA  
SANTO DOMINGO S.A.**

**BLANCA YAZMÍN JÁUREGUI JAIMES**

**TRABAJO DE GRADO  
Presentado como requisito para optar por el título de  
Microbióloga**

**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA  
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS  
PROGRAMA DE MICROBIOLOGÍA  
PAMPLONA  
COLOMBIA  
2017**

**VALIDACIÓN SECUNDARIA DEL MÉTODO DE FILTRACIÓN POR MEMBRANA  
PARA LA DETECCIÓN DE COLIFORMES TOTALES, *Escherichia coli* Y  
*Pseudomonas aeruginosa* EN AGUAS EMPLEADAS EN PASTEURIZADORA  
SANTO DOMINGO S.A.**

**BLANCA YAZMÍN JÁUREGUI JAIMES**

**TRABAJO DE GRADO  
Presentado como requisito para optar por el título de  
Microbióloga**

**TUTOR ACADÉMICO:  
PhD. ENRIQUE ALFONSO CABEZA HERRERA**

**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA  
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS  
PROGRAMA DE MICROBIOLOGÍA  
PAMPLONA  
COLOMBIA  
2017**

**Nota de aceptación:**

---

---

---

---

---

**Jurado 1**

---

**Jurado 2**

## DEDICATORIA

*Dedico el producto de mi esfuerzo y dedicación, al rey de la vida y autor primordial de cada paso, Dios, quien fue mi guía, mi luz, mi perseverancia, mis fuerzas y quién por medio de muchos instrumentos obró desde el primer momento para alcanzar este logro.*

*A mis padres, Blanca Jaimés y Marco Tulio Jáuregui, los motores y la motivación de cada uno de mis sueños, porque más que mío, el triunfo es de ellos por hacer de mí lo que hoy en día soy.*

*Al mejor regalo que la vida me ha regalado, mi sobrina, Laura Sofía, la inspiración más grande, la que cada día con su sola existencia me daba mil razones para levantarme en las caídas y aprender de las batallas.*

## AGRADECIMIENTOS

*En primer lugar, las gracias totales son a Dios por ser la fuente de mi fortaleza y de mis ganas de luchar todos los días. Porque cuando sentí desfallecer, ponía en mi camino todas las respuestas que necesitaba.*

*Gracias a mis padres, por cada una de las cosas que han hecho por mí, por formarme, apoyarme, acompañarme y amarme de la forma que lo han hecho. Porque fueron los que durante a lo largo de mi vida, con su esfuerzo buscaron darme lo mejor y ayudarme a escalar grandes montañas y alcanzar hasta los más difíciles retos. Y junto a ellos, a toda mi familia, mi hermano, sobrina, primas, tíos; porque han sido la palabra de aliento en este gran proceso.*

*Gracias a la mejor compañía que pude tener durante este proceso, ese hombre que todos los días me recordaba los motivos por los cuales seguir y siempre con su apoyo me daba una gran motivación para continuar.*

*Gracias a los docentes del programa de Microbiología de la Universidad de Pamplona, especialmente al profe Félix Ortiz, al profe Danny Piscioti y a el profe Enrique Cabeza, porque fueron un libro abierto dispuestos a compartir su ayuda y sus conocimientos para mi formación profesional y personal a lo largo de estos años en la Universidad.*

*Gracias a la Pasteurizadora Santo Domingo S.A. por la oportunidad de desarrollar mi pasantía allí. De forma especial, gracias al equipo de analistas del laboratorio de control de calidad por cada una de sus enseñanzas.*

*Gracias a mis amigas, mis confidentes y mis compañeras de este gran camino; Mile, Leidy, Joha, Yenny y Vivi. Fue una grata bendición contar con ellas, no habría sido lo mismo con amigas que me enseñaron a cada día perseverar por lo que se quiere, especialmente a Mile, mi parcerera, mi confidente y mi hermana de corazón.*

*"Todo lo puedo en Cristo que me fortalece"*  
*Filipenses 4, 13*

## Tabla de contenido

INTRODUCCIÓN .....	13
1. OBJETIVOS.....	14
1.1 OBJETIVO GENERAL .....	14
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	14
2. JUSTIFICACIÓN.....	15
3. MARCO REFERENCIAL .....	16
3.1 BASES LEGALES.....	16
3.2 ANTECEDENTES .....	17
3.3 MARCO TEÓRICO.....	17
3.3.1 Validación .....	17
3.3.1.1 Validación primaria.....	18
3.3.1.2 Validación secundaria .....	18
3.3.1.3 Tipos de validación .....	18
3.3.2 Parámetros que intervienen en el proceso de validación .....	19
3.3.2.1 Límite de detección .....	19
3.3.2.2 Límite de cuantificación.....	19
3.3.2.3 Exactitud .....	19
3.3.2.4 Especificidad .....	19
3.3.2.5 Selectividad.....	19
3.3.2.6 Precisión .....	19
3.3.2.7 Robustez.....	20
3.3.3 El agua .....	20
3.3.4 Microorganismos indicadores de contaminación del agua .....	21
3.3.4.1 Coliformes Totales .....	21
3.3.4.2 Coliformes Fecales .....	21
3.3.4.3 Otros indicadores de contaminación .....	22
3.3.5 Filtración por membrana.....	22
3.3.5.1 Generalidades de la filtración por membrana.....	22
3.3.5.2 Equipo de Filtración por membrana .....	22
4. METODOLOGÍA .....	23
4.1 MATERIALES .....	23
4.1.1 Reactivos.....	23

4.1.2	Cepas .....	23
4.1.3	Material de vidrio .....	23
4.1.4	Material estéril .....	23
4.1.5	Equipos.....	24
4.2	MÉTODOS .....	24
4.2.1	Evaluación de equipos.....	24
4.2.2	Control de ambientes.....	24
4.2.3	Control de superficies .....	24
4.2.4	Cepas de referencia .....	25
4.2.5	Control de calidad de los medios de cultivo.....	25
4.2.6	Control de esterilización de las autoclaves.....	25
4.2.7	Control de crecimiento de los microorganismos .....	26
4.2.8	Validación del método de filtración por membrana para detección de Coliformes Totales, <i>Escherichia coli</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	27
4.2.8.1	Estandarización de los inóculos a partir del Patrón McFarland...	27
4.2.8.2	Filtración por membrana .....	28
4.2.8.3	Preparación de un pool de <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 y <i>Citrobacter freundii</i> ATCC 43864.....	28
4.2.8.4	Prueba en matriz de agua potable y control negativo .....	28
4.2.8.5	Prueba de repetibilidad .....	29
4.2.8.6	Prueba de reproducibilidad .....	29
4.2.8.7	Prueba de robustez.....	29
4.2.9	Análisis de rutina de Pasteurizadora Santo Domingo S.A.....	29
5.	CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.....	30
6.	RESULTADOS Y DISCUSIONES .....	31
6.1	Evaluación de equipos .....	31
6.2	Control de ambientes y superficies .....	31
6.3	Control de calidad de los medios de cultivo .....	31
6.4	Prueba de esterilidad de los medios de cultivo .....	38
6.5	Control de esterilidad de las autoclaves.....	38
6.6	Validación del método de filtración por membrana para detección de Coliformes Totales, <i>Escherichia coli</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	39
6.6.1	Estandarización del inóculo y técnica de Filtración por Membrana ...	39
6.6.2	Repetibilidad y Reproducibilidad.....	42

6.6.3	Preparación de un pool de <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 y <i>Citrobacter freundii</i> ATCC 43864 .....	47
6.6.4	Prueba en una matriz de agua potable y control negativo .....	48
6.7	Análisis de rutina de Pasteurizadora Santo Domingo S.A.....	50
7.	CONCLUSIONES .....	54
8.	RECOMENDACIONES.....	55
9.	GLOSARIO .....	56
10.	BIBLIOGRAFÍA.....	57
11.	ANEXOS .....	60

## Lista de tablas

Tabla 1. Productividad del medio de cultivo de acuerdo al índice de crecimiento absoluto (ICA) para el microorganismo referente o de interés.....	27
Tabla 2. Selectividad del medio de cultivo de acuerdo al ICA para el microorganismo interferente.....	27
Tabla 3. Resultado del método ecométrico para <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739, <i>Citrobacter freundii</i> ATCC 43864, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 y <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 en Agar Chromocult y Agar PC .....	32
Tabla 4. Resultados obtenidos a partir del ensayo de filtración de las cepas analizadas de las diluciones de $10^{-2}$ a $10^{-7}$ .....	40
Tabla 5. Recuento obtenido a partir de los ensayos realizados para la prueba de repetibilidad de la filtración de <i>E. coli</i> ATCC 8739 en base a las diluciones $10^{-6}$ y $10^{-7}$ del Patrón McFarland 0,5.....	43
Tabla 6. Recuento obtenido a partir de los ensayos realizados para la prueba de repetibilidad de la filtración de <i>C. freundii</i> ATCC 43864 en base a las diluciones $10^{-6}$ y $10^{-7}$ del Patrón McFarland 0,5.....	43
Tabla 7. Recuento obtenido a partir de los ensayos realizados para la prueba de repetibilidad de la filtración de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027 en base a las diluciones $10^{-6}$ y $10^{-7}$ del Patrón McFarland 0,5 .....	44
Tabla 8. Valor t calculado a partir de los análisis de repetibilidad .....	45
Tabla 9. Resultados obtenidos de los ensayos de reproducibilidad de la técnica de filtración por membrana .....	46
Tabla 10. Valor t calculado en comparación del valor t tabulado para el análisis de hipótesis de las dos cepas en las dos diluciones estudiadas .....	46
Tabla 11. Resultado de crecimiento evidenciado de la filtración de las muestras de agua potable con las cepas inoculadas .....	49
Tabla 12. Resultados de las características fisicoquímicas del agua potable empleada para el proceso de filtración .....	49
Tabla 13. Plan de muestreo realizado en Pasteurizadora Santo Domingo S.A. ...	51
Tabla 14. Análisis de rutina realizados en Pasteurizadora Santo Domingo con los métodos, medios de cultivo y períodos de incubación utilizados para cada uno .....	52

## Listas de Figuras

Figura 1. Demostración del método ecométrico utilizado para la evaluación de medios de cultivo .....	26
Figura 2. Estandarización del inóculo y preparación de las diluciones.....	28
Figura 3. Cabina de flujo laminar de trabajo de Pasteurizadora Santo Domingo S.A. ....	31
Figura 4. Crecimiento obtenido a partir del test ecométrico de <i>E. coli</i> en Agar PC (A) y Agar Chromocult (B) .....	33
Figura 5. Resultados de <i>E. coli</i> ATCC 8739 de la prueba oxidasa (A), prueba catalasa (B) y tinción de Gram (C) en aumento de 100 X.....	33
Figura 6. Test ecométrico de <i>C. freundii</i> ATCC 43864 en Agar Plate Count (A) y Agar Chromocult (B) .....	34
Figura 7. Comportamiento de <i>C. freundii</i> ATCC 43864. Prueba de oxidasa (A). Prueba de Catalasa (B). Tinción de Gram (C) en 100 X.....	34
Figura 8. Test ecométrico de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 en Agar Plate Count (A), Agar Chromocult (B) y Agar Cetrimide (C) bajo luz UV y (D) .....	35
Figura 9. Comportamiento de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027. Prueba de oxidasa (A), catalasa (B). Tinción de Gram (C) bajo aumento de 100 X .....	36
Figura 10. Test ecométrico de <i>S. aureus</i> ATCC 6538 en Agar Plate Count (A), Chromocult (B) y Cetrimide (C).....	37
Figura 11. Resultados de <i>S. aureus</i> ATCC 6538 de la prueba de oxidasa (A), catalasa (B) y tinción de Gram (C) en aumento 100 X .....	37
Figura 12. Ampolla Sterikon plus Bioindicador luego del proceso de esterilización .....	38
Figura 13. Preparación Patrón McFarland. A: Control Caldo BHI. B: Patrón McFarland 0,5 comercial. C: Patrón preparado a partir de una colonia de cada microorganismo. <i>Escherichia coli</i> (1). <i>Citrobacter freundii</i> (2). <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (3).....	39
Figura 14. Crecimiento de las cepas producto del primer ensayo de filtración. A: <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739. B: <i>Citrobacter freundii</i> ATCC 43864. C: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 .....	41
Figura 15. Linealidad del método de filtración por membrana.....	42
Figura 16. Colonias de <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 y <i>Citrobacter freundii</i> ATCC 43864 producto de la filtración de una muestra con un pool de los dos microorganismos .....	48
Figura 17. Controles negativos filtrados a partir de muestras de agua potable sin inocular .....	50

## Lista de Anexo

Anexo 1. Certificado de <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739.....	60
Anexo 2. Certificado de <i>Citrobacter freundii</i> ATCC 43864 .....	61
Anexo 3. Certificado de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 .....	62
Anexo 4. Certificado de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 .....	63
Anexo 5. Protocolo de reactivación de cepas de referencia.....	64
Anexo 6. Protocolo de Filtración por Membrana (Standard Methods 9222) .....	65
Anexo 7. Certificado Patrón de Turbidez McFarland 0,5 comercial.....	66
Anexo 8. Control de autoclave de esterilización de material contaminado.....	67
Anexo 9. Control de autoclave de esterilización de material limpio .....	68
Anexo 10. Control de humedad relativa y temperatura ambiente de laboratorio de microbiología .....	69
Anexo 11. Control de temperatura de nevera de refrigeración de las cepas de referencia.....	70
Anexo 12. Control de temperatura incubadora .....	71

## INTRODUCCIÓN

La validación de ensayos llevados a cabo dentro de un laboratorio de control de calidad, constituye una herramienta importante para determinar que dichos ensayos son confiables y reproducibles y por tanto favorecen a cumplir con los estándares en el aseguramiento de la calidad. Es necesario para ello, también tener en cuenta lo estipulado por la normativa vigente. Por un lado, la Norma Internacional ISO 17025 establece los requisitos que un laboratorio debe tener en cuenta para garantizar el cumplimiento de un sistema de gestión de calidad eficiente donde se efectúen procedimientos de ensayos o calibración. De igual forma, el ICONTEC ha elaborado una serie de normas relacionadas con el aseguramiento de la calidad de métodos de ensayo, procedimientos y validación de los mismos como la NTC 5014 (Validación de métodos alternos) (ICONTEC, 2001a), NTC 5699 (Aseguramiento de la Calidad en laboratorios de microbiología) (ICONTEC, 2009a) entre otras. Por otra parte, en Colombia, la Resolución 2115 de 2007 señala algunos parámetros para el control y la vigilancia del agua de consumo humano.

Respecto a la evaluación de la calidad del agua, este representa un punto importante en las plantas procesadoras de alimentos, dado que en la mayor parte de los procesos que se realizan, el agua constituye un punto determinante en factores que involucran la calidad e inocuidad. La necesidad del análisis de esta matriz, en parte se debe a que es un vehículo de transmisión de microorganismos causantes de enfermedades cuando no se han llevado a cabo procesos de potabilización correctos. En cuanto a los microorganismos más representativos se encuentran el grupo de los coliformes, donde se encuentran géneros como *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. y *Citrobacter* spp. entre otros, en el grupo de coliformes totales; y *Escherichia coli* como un coliforme fecal. También, uno de los microorganismos considerado como “otro indicador” de contaminación, es *Pseudomonas aeruginosa*, ya que al ser una bacteria cosmopolita puede encontrarse en diferentes ambientes incluyendo el agua.

La Pasteurizadora Santo Domingo S.A. dentro de sus análisis de rutina, cuenta con el análisis de aguas que se emplean en los diferentes procesos e higienización llevados a cabo en la planta, los cuales se realizan mediante la técnica de filtración por membrana. Mediante el presente trabajo, se busca validar esta técnica empleando las cepas de referencia *Escherichia coli* ATCC 8739, *Citrobacter freundii* ATCC 43864, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 en Agar Chromocult y Agar Cetrimide a fin de establecer que los resultados que se obtienen son confiables y reproducibles.

## 1. OBJETIVOS

### 1.1 OBJETIVO GENERAL

- Realizar la validación secundaria del método de filtración por membrana para la detección de Coliformes Totales, *E. coli* y *P. aeruginosa* en aguas utilizadas en Pasteurizadora Santo Domingo S.A.

### 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar el crecimiento de cada cepa en los medios de cultivo estipulados en función del microorganismo, mediante el uso del método ecométrico.
- Determinar la repetibilidad y reproducibilidad del método de filtración por membrana en la detección de microorganismos indicadores de contaminación del agua.
- Verificar la selectividad y crecimiento de Coliformes Totales y *Escherichia coli* en Agar Chromocult y *Pseudomonas aeruginosa* en Agar Cetrimide.
- Cumplir con las actividades rutinarias llevadas a cabo en el laboratorio de control de calidad de la Pasteurizadora Santo Domingo S.A.

## 2. JUSTIFICACIÓN

El agua es un recurso natural usado en diversas actividades cotidianas dentro de las cuales se encuentra su uso en procesos que involucra a los alimentos, por tanto, evaluar la calidad del agua es una medida de gran interés dado que esta es un medio de transmisión de enfermedades de origen microbiano.

Dentro de las actividades que se realizan en el laboratorio de control de calidad de la Pasteurizadora Santo Domingo S.A. se encuentra el análisis rutinario de la calidad del agua ya que su empleo se ve reflejado en el lavado de equipos, maquinaria, tanques, silos y carros que tienen contacto directo con el producto que allí se procesa. Además, esta matriz se ve involucrada en la elaboración de producto terminado, tal es el caso del alimento lácteo.

También, uno de los requisitos que plantea la Norma Internacional ISO 17025 establece que los laboratorios deben validar y verificar los métodos que realiza teniendo en cuenta las normas nacionales o internacionales de acuerdo al tipo de análisis que ejecuta.

Por tal motivo, en busca de la acreditación de calidad y de constatar que los análisis correspondientes al agua son confiables y garantizan la consistencia en los resultados que se obtienen, el presente trabajo tiene por objeto la validación del método de filtración por membrana empleando cepas de referencia y utilizando Agar Chromocult para la detección de coliformes totales y fecales; y Agar Cetrimide para la de *P. aeruginosa*, microorganismos indicadores de contaminación. Dicha validación favorece a determinar que los resultados que se obtienen a partir de este método son confiables, reproducibles y por tanto permiten establecer la calidad del agua que se analiza.

### 3. MARCO REFERENCIAL

#### 3.1 BASES LEGALES

De acuerdo con la normativa vigente, se encuentra:

- Norma Técnica Colombiana NTC-ISO/IEC 17025 (2005). Por medio de la cual se establece los requisitos y parámetros generales para la competencia en la realización de ensayos y/o de calibraciones, incluidos métodos normalizados, no normalizados y desarrollados por el mismo laboratorio (ICONTEC, 2005).
- Norma Técnica Colombiana. NTC 4092 de 2009. Microbiología de alimentos y productos para la alimentación animal. Requisitos generales y directrices para análisis microbiológicos (ICONTEC, 2009b).
- Guía Técnica Colombiana. GTC 84 de 2003. Calidad del Agua. Guía para la orientación acerca de los análisis de validación de métodos de análisis microbiológicos (ICONTEC, 2003).
- Guía Técnica Colombiana GTC 171 de 2008. Soporta la metodología para la evaluación del desempeño de los medios de cultivo preparados por el laboratorio (ICONTEC, 2008a).
- Norma Técnica Colombiana. NTC 4458 de 2007. Microbiología de Alimentos y Alimentos para Animales. Método horizontal para el recuento de coliformes o *Escherichia coli* o ambos. Técnica de recuento de colonias utilizando medios fluorogénicos o cromogénicos (ICONTEC, 2007).
- Norma Técnica Colombiana. NTC 4772 de 2008. Calidad del Agua. Detección y Recuento de *Escherichia coli* y de bacterias coliformes. Parte 1: Método de Filtración por Membrana (ICONTEC, 2008b).
- Norma Técnica Colombiana. NTC 4940 de 2001. Calidad del Agua. Enumeración de *Pseudomonas aeruginosa*. Técnica del número más probable, NMP (ICONTEC, 2001b).
- Resolución 2115 de 2007 del Ministerio de Protección Social, Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. Por medio de la cual se señalan características, instrumentos básicos y frecuencias del sistema de control y vigilancia para la calidad del agua para consumo humano (Ministerio de Protección Social, 2007).

## **3.2 ANTECEDENTES**

Respecto a la validación de detección de Coliformes Totales, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* en agua por el método de filtración por membrana, existen numerosos ensayos realizados en Colombia basados en el mismo método.

Por ejemplo, en el año 2008 en la Universidad Javeriana, Páez Lilian realizó la validación secundaria del método de filtración por membrana para la detección de coliformes totales y *E. coli* en muestras de aguas para consumo humano analizadas en el laboratorio de salud pública del Huila (Páez, 2008). Por medio de este trabajo logró concluir que el método era confiable y reproducible, determinando a su vez la exactitud y precisión del mismo al analizar los parámetros de aceptabilidad de las desviaciones estándar de los ensayos llevados a cabo.

También, Ospino Gabriel, de la Universidad de Pamplona, en el año 2013 llevó a cabo un ensayo de filtración por membrana para la detección de coliformes totales y *Escherichia coli* en aguas (Ospino, 2013). En su estudio logró realizar la validación secundaria del método usando Agar Colinstant y a su vez determinó parámetros de repetitividad, reproducibilidad y robustez de la técnica a fin de verificar la confiabilidad de la misma.

Más recientemente, en el año 2016, Vergara María Angélica, realizó la validación del método de filtración por membrana para las muestras analizadas en el Laboratorio QC S.A.S. y logró concluir que dicho método es repetible, reproducible, exacto y específico (Vergara, 2016).

Así como los mencionados, son diversos los trabajos que han llevado a cabo diferentes laboratorios de análisis a fin de lograr validar esta técnica y verificar de este modo la confiabilidad de los resultados y de sus ensayos.

## **3.3 MARCO TEÓRICO**

### **3.3.1 Validación**

El término validación, puede definirse como el procedimiento mediante el cual se busca verificar los parámetros establecidos de un determinado método para de este modo demostrar que los resultados obtenidos de dicho método son confiables y reproducibles (Instituto de Salud Pública, Chile , 2010). La validación de un método, también busca garantizar que los análisis que se han realizado en un laboratorio cumplen al mínimo los requisitos de calidad

(Ospino, 2013). De este modo, la validación también pretende documentar las pruebas obtenidas de un ensayo y así demostrar la veracidad de una técnica en un análisis determinado (Páez, 2008).

Durante la realización de una validación, es determinante los métodos cualitativos y cuantitativos de análisis microbiológicos que permiten determinar la confiabilidad de los métodos ejecutados dentro de un laboratorio (Ospino, 2013).

#### **3.3.1.1 Validación primaria**

Se define como un proceso en el cuál se pretende establecer los límites operacionales y caracterizar el desempeño de un nuevo método, o un método modificado (Vergara, 2016). Dentro de este proceso, debe tenerse en cuenta que se generen especificaciones numéricas y descriptivas que aborden de forma precisa el objetivo del método ejecutado (ICONTEC, 2003).

#### **3.3.1.2 Validación secundaria**

Se basa en comprobar experimentalmente un método ya existente de acuerdo con las especificaciones estándares de dicho método. De este modo, esta validación tiene por objeto verificar que los resultados obtenidos a partir de un análisis son confiables y cumplen con los requisitos establecidos (Páez, 2008).

#### **3.3.1.3 Tipos de validación**

- **Validación prospectiva:** Se refiere a toda la información que se obtiene antes de iniciar la implementación de una validación. En este tipo de validación se debe tener en cuenta un análisis de riesgos para establecer las posibles situaciones críticas que pueden presentarse. Así pues, se realizan los ensayos para determinar si el proceso es aceptable acorde con los resultados obtenidos (Ortiz, 2008).
- **Validación concurrente:** En el caso de la validación concurrente, la información se obtiene durante el proceso de implementación de un ensayo. Para ello es importante el seguimiento y monitoreo de las variables evaluadas a fin que el proceso se lleve bajo control (Cabrera, 2015).
- **Validación retrospectiva:** Para este tipo de validación es necesario contar con la recolección y selección de la información para establecer la confiabilidad del método.  
Es importante manejar protocolos específicos y llevar los controles de ambientes, superficies, equipos y maquinaria que sean necesarios para sustentar la veracidad de los datos que se obtengan (Ospino, 2013).

- **Revalidación:** Consiste en repetir un mismo procedimiento o parte de este cuando se ha realizado algún cambio o modificación en uno de los parámetros que sean críticos en el método (Ortiz, 2008). La revalidación no implica que el proceso tenga que ser repetido completamente, sólo busca asegurar que los posibles cambios, bien sea ocasionales o no, no afecten los resultados del proceso (Padilla, 2007).

### **3.3.2 Parámetros que intervienen en el proceso de validación**

#### **3.3.2.1 Límite de detección**

Es la concentración mínima del analito que puede detectarse en una matriz sin necesidad de ser cuantificada bajo determinadas condiciones. Es un número que se expresa en unidades de concentración y determina el nivel más bajo de analito que puede detectarse estadísticamente con un valor diferente al blanco (Ospino, 2013).

#### **3.3.2.2 Límite de cuantificación**

Se define como la menor concentración real en la que se determina el analito con confiabilidad en determinadas condiciones específicas (Páez, 2008).

#### **3.3.2.3 Exactitud**

La exactitud se entiende como la cercanía que presenta un resultado en comparación con un valor de referencia. Dichos valores de referencia están en función de la normativa vigente bien sea nacional o internacional. La exactitud se expresa en valor de porcentaje de acuerdo a la recuperabilidad de microorganismos que se obtengan del ensayo de validación ejecutado (Ospino, 2013).

#### **3.3.2.4 Especificidad**

Es la capacidad que presenta el método para determinar de manera inequívoca el analito estudiado aún en presencia de posibles interferentes u otros compuestos presentes en una determinada muestra (Vergara, 2016).

#### **3.3.2.5 Selectividad**

Se define como la capacidad de un método de generar resultados exactos independientemente del analito de interés. En el caso de análisis microbiológicos, la selectividad aplica cuando se trabaja con diversos grupos de microorganismos, evaluando la capacidad del método para detectarlos y diferenciarlos (Ospino, 2013).

#### **3.3.2.6 Precisión**

Hace referencia a la concordancia que existe entre los resultados obtenidos a partir del análisis de un método cuando se realizan diversos ensayos. La variable que estadísticamente se evalúa es la variación estándar que permite

evaluar la dispersión de los datos en función a la media o promedio (Páez, 2008).

La precisión se evalúa bien sea en cuanto a la repetibilidad o reproducibilidad. En cuanto a la repetibilidad se establece mediante la realización del mismo ensayo, por el mismo analista siempre bajo los mismos parámetros. Para el caso de la reproducibilidad, se determina la concordancia de los datos cuando se cambia una de las condiciones del análisis, por ejemplo, cuando los ensayos son llevados a cabo por diferentes analistas (Padilla, 2007).

### **3.3.2.7 Robustez**

Es el comportamiento de los datos cuando se someten a evaluarse bajo diferentes condiciones a fin de obtener las pequeñas variaciones que puedan manifestar en función de la variable que se examine (Vergara, 2016).

### **3.3.3 El agua**

El agua constituye un líquido vital en la vida del ser humano, ya que es el elemento más abundante en el planeta, que brinda innumerables beneficios en diferente tipo de actividades.

En el caso del agua potable, la Resolución 2115 de 2007 del Ministerio de Protección Social, establece que un agua potable es aquella que cumple con las características fisicoquímicas y microbiológicas para ser apta para el consumo humano (Ministerio de Protección Social , 2007).

Dentro de las características que debe presentar el agua potable, se estipula que debe estar libre de microorganismos patógenos y aquellos que se consideran como indicadores de contaminación fecal. Además, el agua debe estar limpia, transparente, incolora, inodora, de sabor agradable y no debe contener sustancias o cuerpos extraños bien sea de origen biológico, orgánico, inorgánico o radioactivo (Ministerio de Protección Social , 2007).

Una de las utilidades del agua es en los procesos de higienización para el lavado de equipos y maquinaria que se emplean dentro de una determinada industria. A su vez, el agua es propensa a diversas fuentes de contaminación, bien sea de forma directa o indirecta, a causa de desechos o excretas del hombre y de los animales. Dentro de las posibles enfermedades de transmisión por medio de este vehículo se encuentran enfermedades entéricas ocasionadas por microorganismos (Carrillo y Lozano, 2008).

Es por ello, que la necesidad de realizar análisis para determinar la calidad del agua es un factor de gran importancia que favorece a determinar el aseguramiento en la calidad de la misma y su función dentro de la industria alimentaria.

### 3.3.4 Microorganismos indicadores de contaminación del agua

Son diversos los microorganismos de origen fecal que pueden contaminar y estar presentes en agua crudas, residuales o en agua mal tratadas en procesos de potabilización. Puede encontrar microorganismos de los géneros de *Salmonella* spp., *Shigella* spp. y como los más comunes, microorganismos pertenecientes al grupo de los coliformes.

#### 3.3.4.1 Coliformes Totales

Los Coliformes Totales son microorganismos del grupo de las Enterobacterias. Pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* y presentan la capacidad de fermentar la lactosa produciendo ácido y gas. Su crecimiento se da de las 24 a 48 horas y su temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre los 30 – 37 °C (Vergara, 2016).

Son bacilos Gram negativos, aerobias o anaerobias facultativas, oxidasa negativa, no formadoras de esporas con actividad  $\beta$  – galactosidasa. Se usan con microorganismos indicadores de contaminación del agua de consumo humano ya que son microorganismos que habitan en el ambiente, y por ende pueden localizarse en los suelos, aguas, aire o lugares propensos a su proliferación (Ospino, 2013). Algunos de los géneros pertenecientes a este grupo son *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp. y *Citrobacter* spp.

#### 3.3.4.2 Coliformes Fecales

Dentro de los microorganismos estudiados, se encuentra *Escherichia coli*, el cual es un indicativo de contaminación fecal en agua, dado a que esta bacteria habita en el tracto gastrointestinal de los animales y pueden llegar al ambiente y propagarse fácilmente. El problema con esta bacteria radica en que puede ser un agente causal de gastroenteritis o incluso causar casos clínicos crónicos en pacientes susceptibles al consumir agua contaminada (Carrillo, *et al.*, 2008).

*E. coli* se caracteriza por la capacidad de producir indol a partir del triptófano. Además de poseer la enzima  $\beta$  – galactosidasa, se diferencia del grupo de los coliformes totales por presentar también la enzima  $\beta$  – D – glucoronidasa (Ospino, 2013).

En el caso de la enzima  $\beta$  – galactosidasa, reacciona de forma positiva con el ensayo de rojo metilo y así descarboxila el ácido L – glutámico (Millipore, 2005). En cuanto a la enzima  $\beta$  – D – glucoronidasa, esta enzima presenta la capacidad de degradar el sustrato fluorogénico 4 – metilumbeliferil –  $\beta$  – D – glucoronido (MUG), en 4 – metilumbeliferona (Ospino, 2013).

### **3.3.4.3 Otros indicadores de contaminación**

En cuanto a otros microorganismos que se caracterizan como “otros” indicadores de contaminación, se encuentra *Pseudomonas aeruginosa*, que se caracteriza por ser una bacteria cosmopolita que presenta diversos hábitats, dentro de los cuales se encuentra el agua, y por ende su determinación en dicha matriz es primordial como indicador de malos procesos de potabilización (IDEAM, 2007).

### **3.3.5 Filtración por membrana**

#### **3.3.5.1 Generalidades de la filtración por membrana**

Respecto al método de filtración por membrana, es útil para el análisis de agua. El método se basa, principalmente, en la detección de microorganismos indicadores de la contaminación del agua mediante el empleo de filtros de 0,45  $\mu\text{m}$  de diámetro por donde se hace pasar la muestra y gracias a un sistema de bomba al vacío, en el filtro queda suspendida la carga microbiana presente en la muestra, que posteriormente se transfiere a una caja de Petri y se incuba a condiciones óptimas de crecimiento del microorganismo (Vergara, 2016).

Una de las ventajas de esta técnica, es que proporciona resultados altamente confiables y reproducibles favoreciendo a su vez que se analicen grandes volúmenes de muestra. Gracias a este método, se puede determinar la presencia de microorganismos del grupo de coliformes, indicadores de contaminación del agua (Ospino, 2013). También dentro de sus ventajas, cabe mencionar que el método es rápido ya que, en 24 horas, permite detectar el crecimiento de microorganismos presentes en la matriz analizada.

La principal desventaja radica en que, no es favorable para el análisis de muestras muy turbias o muy contaminadas, por lo cual se debe proceder a realizar diluciones de acuerdo con el tipo de agua que se analice (Vergara, 2016).

#### **3.3.5.2 Equipo de Filtración por membrana**

Está elaborado bien sea, de vidrio, plástico o acero inoxidable. Debe ser esterilizable a la autoclave, y no debe presentar fugas. Su diseño debe garantizar que no ocurra daño de la membrana cuando se pase la muestra a través del equipo (Ospino, 2013).

## 4. METODOLOGÍA

Para el desarrollo de la metodología llevada a cabo se trabajó siguiendo los lineamientos establecidos por el Instructivo TC-CC-009 “TECNICA DE FILTRACIÓN POR MEMBRANA PARA AGUA” de Pasteurizadora Santo Domingo S.A. de acuerdo a lo estipulado en el Standard Methods 22ND (9222 H).

### 4.1 MATERIALES

#### 4.1.1 Reactivos

Patrón McFarland 0,5 comercial (ICMT: Instituto Colombiano de Medicina Tropical)  
Tiosulfato de Sodio al 0,1 N  
Colorantes para Tinción de Gram (Cristal Violeta, Lugol, Alcohol cetona, Fucsina)  
Prueba catalasa y oxidasa (Merck)  
Aceite de inmersión  
Solución limpiadora para microscopio  
Agar Chromocult (Merck)  
Agar Cetrimide (Himedia)  
Agar Plate Count (Merck)  
Agar YGC (Merck)

#### 4.1.2 Cepas

*Escherichia coli* ATCC 8739  
*Citrobacter freundii* ATCC 43864  
*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027  
*Staphylococcus aureus* ATCC 6538

#### 4.1.3 Material de vidrio

Frascos schott de 250 mL  
Frascos schott de 500 mL  
Tubos de ensayo  
Portaobjetos

#### 4.1.4 Material estéril

Filtros de membrana de poro de 0,45  $\mu\text{m}$  (Advantec)  
Equipo para filtración de membrana  
Asa redonda calibrada de 0,1 mL  
Asa redonda

Cajas de Petri plásticas pequeñas (Citotest)  
Cajas de Petri plásticas grandes (Citotest)  
Micropipeta P 1000 (Brand)  
Puntas azules estériles

#### **4.1.5 Equipos**

Incubadora de  $35 \pm 2$  °C modelo 1110 (Mettler)  
Microscopio modelo AA 1.2 V NI – MH (Optimus)  
Nevera (Challenger)  
Autoclave para material estéril (All American 50X)  
Autoclave para material de desecho (All American 25X)  
Contador de colonias referencia 007 (Indulab)  
Baño serológico (Mettler)

## **4.2 MÉTODOS**

### **4.2.1 Evaluación de equipos**

Se realizó la evaluación de los equipos y tareas de mantenimiento de cada uno de acuerdo a los estándares estipulados en la Pasteurizadora Santo Domingo S.A según indicaciones del fabricante.

### **4.2.2 Control de ambientes**

Se empleó la técnica de sedimentación en placa, para lo cual se expuso en la cabina de trabajo, durante 20 minutos una caja con Agar Plate Count para el desarrollo de microorganismos aerobios mesófilos y una con Agar YGC para mohos y levaduras. La caja de Agar PC se incubó a  $35 \pm 2$  °C por 48 horas y la de Agar YGC a temperatura ambiente por 5 días. Pasado el período de incubación se realizó la lectura de las cajas. Este control se realizó una vez al día.

### **4.2.3 Control de superficies**

Se llevó a cabo mediante la técnica de hisopado en 10 mL de agua peptona, para lo cual se realizó un barrido a un área delimitada de 100 cm<sup>2</sup> en la cabina de flujo laminar, una vez realizado el barrido se transfirió 0,1 mL a los medios PC, Chromocult y YGC, con el fin de determinar la presencia de aerobios mesófilos, coliformes totales, *Escherichia coli*, mohos y levaduras.

Las cajas fueron incubadas a  $35 \pm 2$ °C por 24 horas y para mohos y levaduras temperatura ambiente por 5 días.

#### **4.2.4 Cepas de referencia**

Fueron utilizadas cepas liofilizadas de la casa comercial Microbiologics®, referencia KWIK-STICK™, las cuales se caracterizan por presentar una unidad autónoma con 2 Pack, cada pack contiene una preparación de microorganismo no enumerada o cualitativa, de cuarto pase proveniente del cultivo de referencia.

Las cepas seleccionadas fueron: *Escherichia coli* ATCC 8739, *Citrobacter freundii* ATCC 43864, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (Ver Anexos 1, 2, 3 y 4).

La reactivación de las cepas se realizó según al protocolo establecido por la casa comercial (Ver Anexo 5).

Después de la reactivación de las cepas, por un lado, se utilizaron para la estandarización del inóculo (cepas de trabajo). Así mismo, para mantener la viabilidad de la cepa, semanalmente se realizó un repique de cada cepa durante el tiempo en el cuál se ejecutó la validación. Para cada ensayo realizado, se tomaron inóculos jóvenes de aproximadamente 18 horas de incubación.

#### **4.2.5 Control de calidad de los medios de cultivo**

Para evaluar la calidad de los medios de cultivo empleados, los cuales fueron Chormocult, Cetrimide, Plate Count y YGC, se empleó la prueba de esterilidad y control de crecimiento de microorganismos en el medio. Para ello, después de preparar cada medio de cultivo siguiendo las indicaciones de la casa comercial, esterilizarlos a 121 °C – 17 PSI durante 15 minutos, y servirlos en placas de Petri pequeñas, se tomó una caja de cada lote preparado y se incubó a  $35 \pm 2$  °C durante 48 horas en el caso de Agar Chromocult, Cetrimide y Plate Count. Para Agar YGC se incubó a temperatura ambiente por 5 días. Cabe mencionar, que el medio de cultivo Chromocult, no se autoclava, por tanto, luego de hervir, se sirve en las cajas de Petri.

#### **4.2.6 Control de esterilización de las autoclaves**

El control de esterilización de las autoclaves se realizó con el fin de verificar la temperatura que alcanzaban los equipos durante los procesos de esterilización. Para ello, se empleó un control físico y un control biológico. El control físico se realizó mediante el empleo de la cinta indicadora, en cuanto al control biológico se hizo utilizando ampollas bioindicadoras de Sterikon® plus. Una vez terminado el proceso de autoclavado, las ampollas se incubaron a 55 °C durante 48 horas y seguidamente se realizó su lectura e interpretación de resultados (Vergara, 2016).

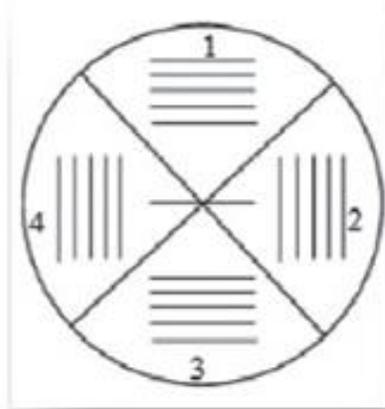
#### 4.2.7 Control de crecimiento de los microorganismos

Para evaluar el crecimiento de las cepas de referencia certificadas mencionadas anteriormente, se llevó a cabo la implementación del test ecométrico descrito por Mossel, *et al.* (1983).

Los microorganismos referentes fueron *Escherichia coli* ATCC 8739 y *Citrobacter freundii* ATCC 43864 en Agar Chromocult y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 en Agar Cetrimide. El microorganismo interferente fue *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 en los dos medios de cultivo. Así mismo, para comprobar que todos los microorganismos crecieran en óptimas condiciones en un medio de cultivo nutritivo, se realizó el test ecométrico de todos los microorganismos en Agar Plate Count (Mossel, *et al.*, 1983).

Para llevar a cabo la técnica, se empleó un asa calibrada de 0,1 mL. El método consiste en dividir la caja de Petri en 4 cuadrantes y sobre ellos realizar 5 estrías en cada uno, la última se realiza en el centro de la caja, todas sin retomar la muestra. La Figura 1 muestra cómo se realizó la técnica (Mossel, *et al.*, 1983).

**Figura 1.** Demostración del método ecométrico utilizado para la evaluación de medios de cultivo



Fuente: (Mossel, *et al.*, 1983).

Se considera válida cualquier estría que contenga un crecimiento mayor o igual al 25%. Cada estría tiene un valor de 0,2 y la del centro un valor de 1. Todos los resultados se deben sumar para obtener el índice de crecimiento absoluto (ICA) (IDEAM, 2007).

La Tabla 1 y 2 muestran la interpretación para evaluar la productividad y selectividad del medio de acuerdo al Valor ICA.

**Tabla 1.** Productividad del medio de cultivo de acuerdo al índice de crecimiento absoluto (ICA) para el microorganismo referente o de interés

ICA	PRODUCTIVIDAD
4,5 - 5	ALTA
2,5 - 4,5	MEDIA
< 2,5	POCA
0	NO PRODUCTIVOS

(Páez, 2008)

**Tabla 2.** Selectividad del medio de cultivo de acuerdo al ICA para el microorganismo interferente

ICA	SELECTIVIDAD
4,5 - 5	NO HAY SELECTIVIDAD
2,5 - 4,5	BAJA
< 2,5	MEDIA
0	ALTA

(Páez, 2008)

Por otro lado, se evaluó también el Índice de Crecimiento Relativo (ICR), el cuál obedece a la comparación del medio de cultivo evaluado con el medio de cultivo de referencia.

$$\text{ICR} = \text{ICAP} / \text{ICAE}$$

ICAP: Índice de crecimiento absoluto del medio de cultivo evaluado

ICAE: Índice de crecimiento absoluto del medio de cultivo de referencia

El valor de ICR debe estar entre 0,9 y 1,0.

#### **4.2.8 Validación del método de filtración por membrana para detección de Coliformes Totales, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa***

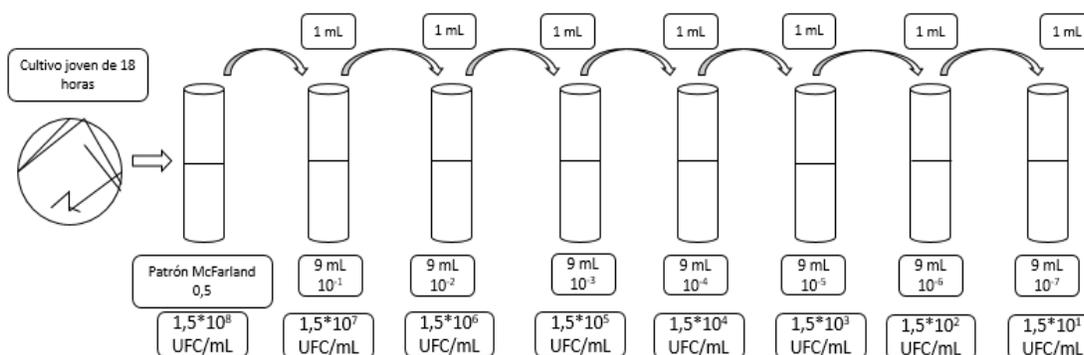
##### **4.2.8.1 Estandarización de los inóculos a partir del Patrón McFarland**

A partir del patrón McFarland comercial de 0.5, se estandarizó los inóculos de las cepas empleadas en el estudio.

Para ello, se tomó un inóculo de cada microorganismo a partir de un cultivo joven de aproximadamente 18 horas y se transfirió en 10 mL de agua peptona; visualmente se hizo la comparación del tubo del microorganismo con el Patrón McFarland comercial que indica una concentración del microorganismo de  $1,5 \cdot 10^8$  UFC/mL.

Seguidamente, se realizaron diluciones hasta la extinción ( $10^{-7}$ ), es decir una concentración de 15 UFC/mL y se inoculó 1 mL en 99 mL de agua destilada estéril de las diluciones  $10^{-2}$  hasta  $10^{-7}$ , como se ilustra en la Figura 2. Dichas muestras de agua inoculadas fueron analizadas mediante la técnica de filtración por membrana.

**Figura 2.** Estandarización del inóculo y preparación de las diluciones



Fuente: Autor

#### 4.2.8.2 Filtración por membrana

Para llevar a cabo el proceso de filtración por membrana en la detección de coliformes totales, coliformes fecales y *Pseudomonas aeruginosa*, la metodología empleada se basó por lo establecido en los Métodos estándar para el examen de aguas y aguas residuales 9222 H y 9213 E (APHA-AWWA-WEF, 2012) (Ver Anexo 6).

#### 4.2.8.3 Preparación de un pool de *Escherichia coli* ATCC 8739 y *Citrobacter freundii* ATCC 43864

A fin de verificar la diferencialidad del crecimiento de coliformes totales y coliformes fecales, se preparó un pool de los dos microorganismos. Para ello, se realizó preparación de los inóculos de *Escherichia coli* ATCC 8739 y *Citrobacter freundii* ATCC 43864. En base a lo que se ilustra en la Figura 2, se trabajaron con las concentraciones del inóculo de  $10^{-6}$  y  $10^{-7}$ . Se tomó 0,5 mL de cada microorganismo y se inoculó en 99 mL de agua a fin de obtener los 100 mL de muestra a pasar a través del filtro. Las cajas con los filtros fueron incubadas a  $35 \pm 2$  °C por 48 horas.

#### 4.2.8.4 Prueba en matriz de agua potable y control negativo

Con el fin de asemejar la matriz de agua potable, se estilizaron 6 frascos schott con 99 mL de agua potable y se inocularon de la siguiente manera: 2 frascos con 1 mL de *Escherichia coli* ATCC 8739 cada uno, 2 frascos con 1 mL *Citrobacter freundii* ATCC 43864 cada uno y 2 frascos con un

0,5 mL de cada uno de los dos microorganismos. Dichas muestras fueron filtradas e incubadas a 24 y 48 horas a  $35 \pm 2$  °C. A las muestras de agua potable, se les adicionó 0,1 mL de Tiosulfato de Sodio al 0,1 N por cada 100 mL de agua.

En cuanto al control negativo, se esterilizaron 2 frascos con agua destilada estéril y 2 con agua potable estéril, sin inocular, y se pasaron a través del filtro. Dichos filtros se transfirieron en Agar Chromocult y se llevaron a incubar a  $35 \pm 2$  °C durante 24 horas, seguidamente se realizó la lectura de los resultados.

#### **4.2.8.5 Prueba de repetibilidad**

Para dicha prueba se realizaron los procedimientos establecidos en el ítem 4.2.8. Se realizaron 8 repeticiones de la prueba y las diluciones trabajadas fueron de  $10^{-6}$  y  $10^{-7}$ .

#### **4.2.8.6 Prueba de reproducibilidad**

Se basó en lo estipulado en el procedimiento del ítem 4.2.8. Se realizaron 2 repeticiones del método cambiando el analista que ejecutó el procedimiento.

#### **4.2.8.7 Prueba de robustez**

Con el fin de verificar la incidencia del tiempo de incubación con los resultados obtenidos, se realizó la prueba de robustez, para lo cual se realizó la lectura del recuento obtenido de la prueba a las 24 y 48 horas (Ospino, 2013).

#### **4.2.9 Análisis de rutina de Pasteurizadora Santo Domingo S.A.**

De acuerdo al plan de muestreo estipulado por el laboratorio de control de calidad de Pasteurizadora Santo Domingo S.A se realizaron análisis de rutina siguiendo los lineamientos estipulados por la empresa (Ver Tabla 11).

También, se realizó la validación de la detección de mohos y levaduras mediante el método de recuento en placa, para lo cual se utilizaron cepas de referencia, en el caso del moho, se trabajó con *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404; y para el caso de la levadura, se empleó *Candida albicans* ATCC 10231.

### 5. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Actividad	Año 2017 - II																											
	Jun			Jul				Agos					Sept				Oct				Nov					Dic		
	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	5	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	5	1	2	
Planteamiento del proyecto	■																											
Realización del anteproyecto		■	■																									
Evaluación de equipos				■	■																							
Control de ambientes y superficies	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Reactivación de las cepas										■		■		■														
Estandarización de los inóculos										■		■		■														
Evaluación de la selectividad y productividad de los medios										■	■		■		■													
Filtración de <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739										■	■																	
Filtración de <i>Citrobacter freundii</i> ATCC 43864													■	■														
Filtración de <i>Pseudonomas aeruginosa</i> ATCC 9027															■	■												
Filtración pool <i>E. coli</i> ATCC 8739 y <i>C. freundii</i> ATCC 43864														■	■													
Filtración muestras de agua potable														■	■													
Pruebas de reproducibilidad, repetitividad y robustez																■	■											
Análisis estadístico																	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Análisis de rutina	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Elaboración Trabajo de Grado													■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Sustentación Trabajo de Grado																											■	■
Revisión Bibliográfica	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

Fuente: Autor

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 6.1 Evaluación de equipos

Diariamente, se realizó el monitoreo de la temperatura de los equipos y así mismo se llevó el registro del uso de los mismos.

### 6.2 Control de ambientes y superficies

El control de ambientes de acuerdo a los parámetros estipulados por la empresa, se realizaron diariamente. Los resultados obtenidos fueron óptimos, ya que no hubo crecimiento de microorganismos mesófilos y mohos y levaduras. Esto garantiza que los procesos de limpieza y desinfección ejecutados en la zona de trabajo del laboratorio de control de calidad de Pasteurizadora Santo Domingo S.A.S son adecuados y realizados de forma correcta (Ver Figura 3).

El control de superficies, realizado en la cabina de trabajo, se realizó semanalmente durante el tiempo en el cuál se realizó la validación. Los resultados fueron de igual forma óptimos, ya que no hubo crecimiento de microorganismos.

**Figura 3.** Cabina de flujo laminar de trabajo de Pasteurizadora Santo Domingo S.A.



Fuente: Autor

### 6.3 Control de calidad de los medios de cultivo

Para evaluar los medios de cultivo, se usó el test ecométrico. Para ello, se realizó la activación de las cepas de referencia y luego del crecimiento de las mismas sobre los medios de cultivo, se realizó la evaluación microscópica de los microorganismos de interés y la confirmación bioquímica por medio de las pruebas de oxidasa y catalasa. A partir del análisis del método ecométrico se evaluó el crecimiento de las cepas de referencia *Escherichia coli* ATCC

8739, *Citrobacter freundii* ATCC 43864, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 en Agar Chromocult y Agar Cetrimide con el fin de determinar la productividad del medio para el crecimiento y desarrollo de los microorganismos. Los resultados se muestran en la Tabla 3. Así mismo se trabajó Agar Plate Count (PC) como medio de cultivo control, donde los microorganismos crecen en óptimas condiciones.

De los resultados obtenidos, se puede establecer que el test ecométrico permite determinar la capacidad de un medio de cultivo para recuperar una cepa en estudio; de este modo, se logró evidenciar que los medios utilizados favorecen a la productividad y selectividad de los microorganismos y así obtener resultados confiables en los ensayos realizados (Villalobos, *et al.*, 2007).

**Tabla 3.** Resultado del método ecométrico para *Escherichia coli* ATCC 8739, *Citrobacter freundii* ATCC 43864, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 en Agar Chromocult y Agar PC

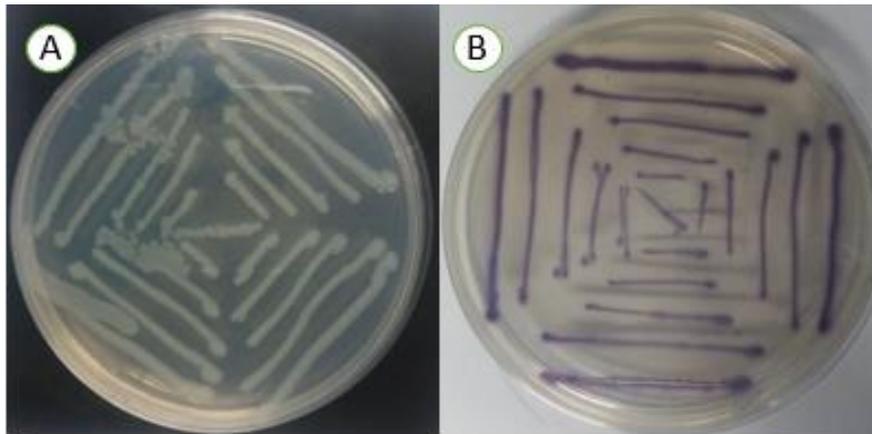
Microorganismo	Medio de Cultivo	ICA	ICR
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	Agar Chromocult	5	1
	Agar PC	5	N/A
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 43864	Agar Chromocult	5	1
	Agar PC	5	N/A
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	Agar Chromocult	5	1
	Agar Cetrimide	5	1
	Agar PC	5	N/A
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Agar Chromocult	0	0
	Agar Cetrimide	0	0
	Agar PC	5	N/A

N/A: No Aplica

Fuente: Autor

La Figura 4 muestra el crecimiento obtenido del análisis ecométrico de *Escherichia coli* ATCC 8739 en Agar Chromocult y Agar PC.

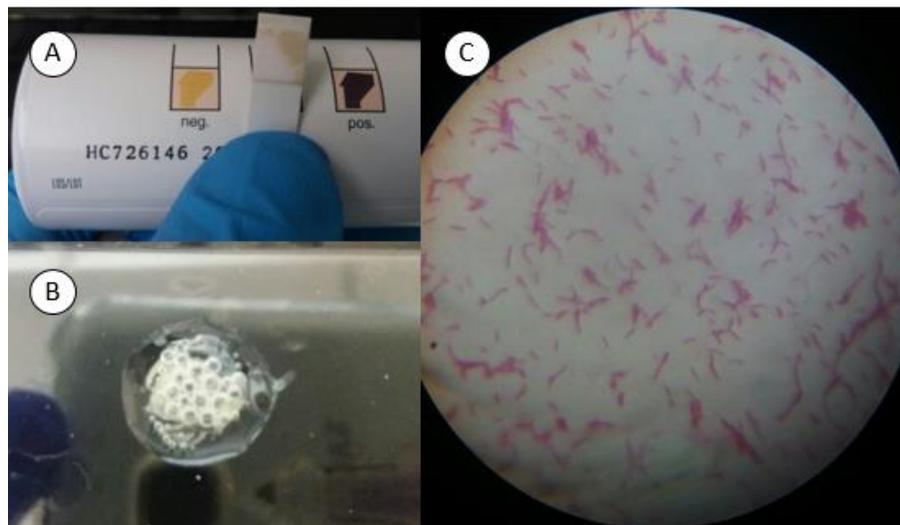
**Figura 4.** Crecimiento obtenido a partir del test ecométrico de *E. coli* en Agar PC (A) y Agar Chromocult (B)



Fuente: Autor

Del crecimiento evidenciado en la Figura 4, se realizó tinción de Gram para determinar la morfología microscópica de la cepa de interés junto con la evaluación de la prueba catalasa y oxidasa, los resultados se presentan en la Figura 5. En el caso de *E. coli*, es un bacilo Gram (-), la prueba de catalasa es positiva, y oxidasa es negativa.

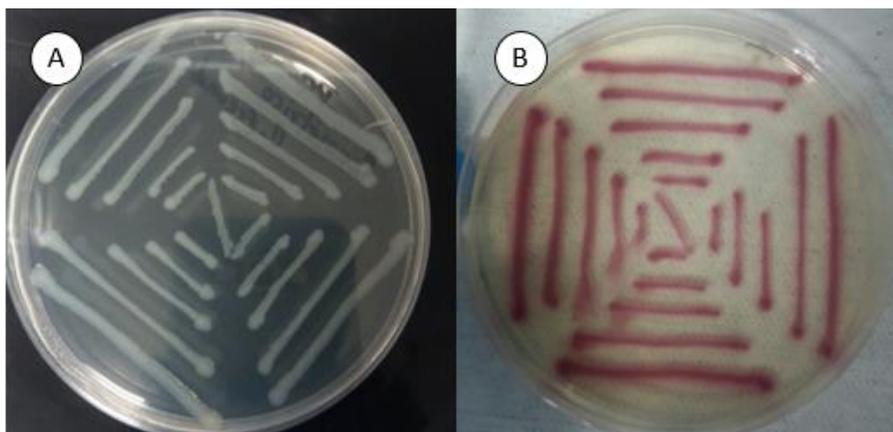
**Figura 5.** Resultados de *E. coli* ATCC 8739 de la prueba oxidasa (A), prueba catalasa (B) y tinción de Gram (C) en aumento de 100 X



Fuente: Autor

El crecimiento de *Citrobacter freundii* en los medios analizados bajo el test ecométrico se muestran en la Figura 6.

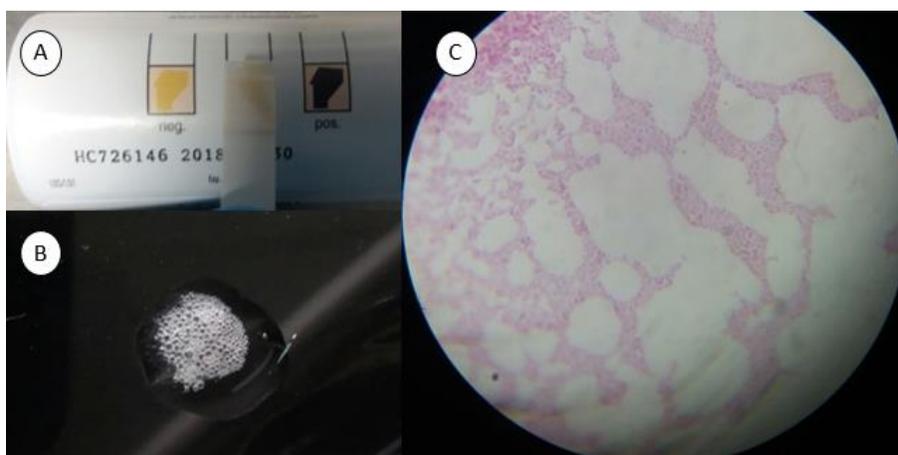
**Figura 6.** Test ecométrico de *C. freundii* ATCC 43864 en Agar Plate Count (A) y Agar Chromocult (B)



Fuente: Autor

Respecto a las características microscópicas y el comportamiento bioquímico de la cepa de *Citrobacter freundii*, la Figura 7 muestra los resultados obtenidos. Este microorganismo, al ser parte del grupo de las Enterobacterias, es un bacilo Gram (-), oxidasa negativa, y catalasa positiva.

**Figura 7.** Comportamiento de *C. freundii* ATCC 43864. Prueba de oxidasa (A). Prueba de Catalasa (B). Tinción de Gram (C) en 100 X



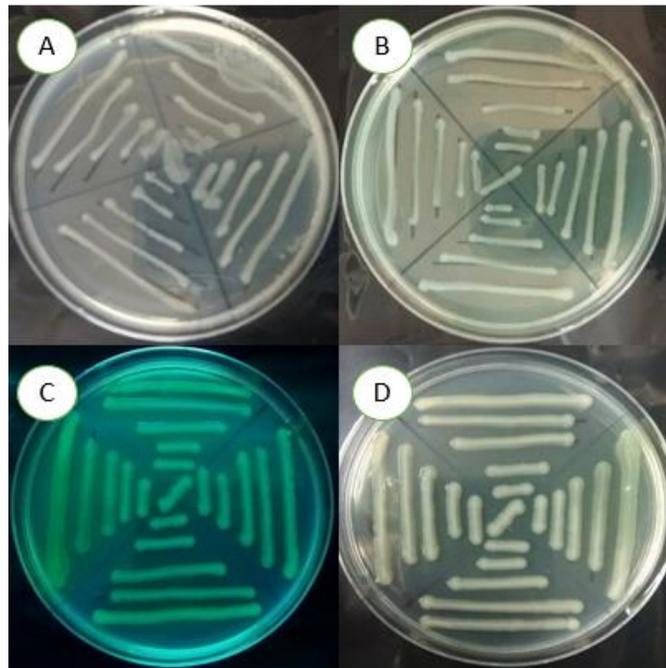
Fuente: Autor

Tal como se muestra en la Figura 4 y 6, una de las ventajas que presentan los medios de cultivo cromógenos como es el caso de Agar Chromocult, es que permite no solo el desarrollo sino también la diferencialidad de los microorganismos. En el caso del recuento de coliformes, es la enzima  $\beta$ -D-galactosidasa quien permite a las bacterias escindir el Salmon-GAL y así generar colonias de color rojo (*Citrobacter freundii*). Respecto al crecimiento

de *Escherichia coli*, ocurre una escisión de dos sustratos, Salmon-GAL y X-glucorónido, mediante la acción de una combinación de dos enzimas,  $\beta$ -D-galactosidasa y  $\beta$ -D-glucoronidasa, respectivamente y por tanto se generan colonias de color violeta a azul oscuro (Millipore, 2014). También, en cuanto al ICA y el valor ICR del medio de cultivo, se logró determinar que el medio favorece totalmente a la productividad de las cepas de interés, ya que como se muestra en la Tabla 3, el valor ICA de este medio para estos dos microorganismos tiene un valor de 5, lo que determina un óptimo crecimiento y desarrollo de las dos bacterias. Respecto al valor ICR, se logra determinar que en comparación del medio de cultivo control, donde las dos cepas crecieron de forma eficiente; el medio de cultivo de referencia, Agar Chromocult, se comporta de la misma forma, garantizando el buen desarrollo de los microorganismos y por tanto su valor es de 1.

Por otro lado, en cuanto a la evaluación del crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, la Figura 8 muestra los resultados del test ecométrico realizado en Agar Plate Count, Chromocult y Cetrimide. También, en cuanto a sus características microscópicas y bioquímicas, la Figura 9 evidencia los resultados obtenidos. Dicho microorganismo, es una bacteria Gram (-), catalasa y oxidasa positiva.

**Figura 8.** Test ecométrico de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 en Agar Plate Count (A), Agar Chromocult (B) y Agar Cetrimide (C) bajo luz UV y (D)

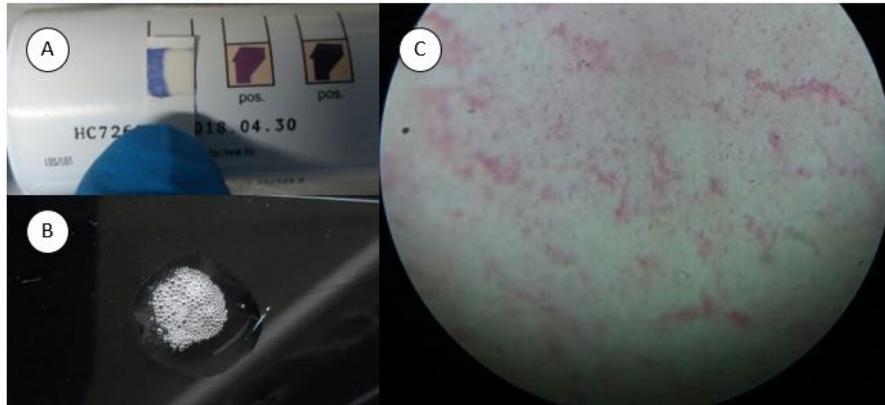


Fuente: Autor

En base a la Figura 8, se logró determinar que tanto agar Chromocult, como agar Cetrimide, favorecen al crecimiento y desarrollo de *Pseudomonas aeruginosa*. En el caso de agar Cetrimide, la Figura 8.C muestra el crecimiento de este microorganismo a la exposición de la luz ultravioleta, esto se da por la producción de piocianina que se estimula mediante el cloruro de magnesio y el sulfato potásico en el medio. La piocianina es un pigmento azul o verde azulado y actúa como biosensor en la detección de dicho microorganismo.

Así mismo, se establece que el valor ICA de los dos medios de cultivo en el desarrollo de esta bacteria es de 5, por su óptimo crecimiento evaluado bajo el test ecométrico; y el valor ICR, es de 1.

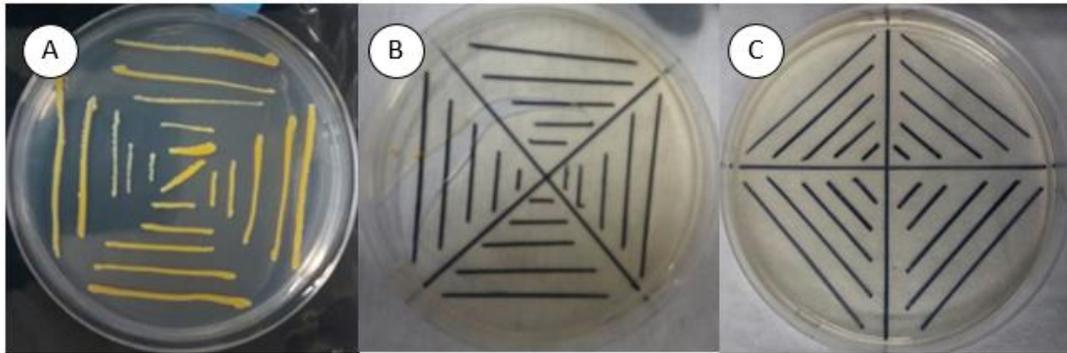
**Figura 9.** Comportamiento de *P. aeruginosa* ATCC 9027. Prueba de oxidasa (A), catalasa (B). Tinción de Gram (C) bajo aumento de 100 X



Fuente: Autor

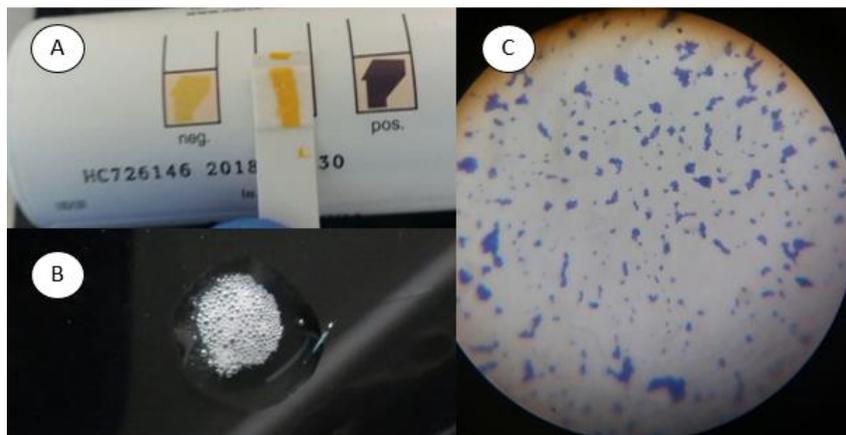
Finalmente, en cuanto a la evaluación del microorganismo interferente, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, los resultados obtenidos a partir del test ecométrico se presentan en la Figura 10. Así mismo, su comportamiento bioquímico y sus características microscópicas se muestran en la Figura 11. Esta bacteria es un coco Gram (+), catalasa positiva y oxidasa negativa.

**Figura 10.** Test ecométrico de *S. aureus* ATCC 6538 en Agar Plate Count (A), Chromocult (B) y Cetrimide (C)



Fuente: Autor

**Figura 11.** Resultados de *S. aureus* ATCC 6538 de la prueba de oxidasa (A), catalasa (B) y tinción de Gram (C) en aumento 100 X



Fuente: Autor

De acuerdo a la Tabla 2, la selectividad de los medios de cultivo Chromocult y Cetrimide es alta, ya que no se presentó el crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 en el test ecométrico realizado para este microorganismo tal como se muestra en la Figura 10. Esto permite concluir que los componentes de los medios de cultivo que favorecen a la selectividad de los mismos son eficientes y por tanto no ocurre el crecimiento de flora acompañante o interferente distinta a la de interés. Por ello, el valor ICA y el ICR de esta bacteria en agar Chromocult y Cetrimide es igual a cero.

Por otro lado, uno de los parámetros realizados para la confirmación de las cepas en estudio, se basó en el análisis de las pruebas catalasa y oxidasa. Para el análisis de todas las cepas, los resultados fueron acertados en base al certificado de cada microorganismo, garantizando que los

microorganismos usados no presentaron la presencia de interferentes o que no tuvieran los comportamientos propios de cada cepa.

#### **6.4 Prueba de esterilidad de los medios de cultivo**

De las cajas seleccionadas para evaluar la esterilidad de los medios de cultivo, no hubo crecimiento de ningún microorganismo en las cajas incubadas a las condiciones mencionadas en el ítem 4.2.5. Por tanto, se garantiza que los medios de cultivo fueron hervidos, en el caso de Agar Chromocult; y esterilizados, para Agar PC, Cetrimide y YGC adecuadamente de manera tal que se aseguró su inocuidad para su manejo y empleo durante los ensayos ejecutados. Así mismo, a cada lote de los medios de cultivo preparados, se le realizó la medición de su pH, los cuales se encontraron todos bajo los parámetros establecidos por la casa comercial de cada medio de cultivo.

#### **6.5 Control de esterilidad de las autoclaves**

Para el caso del uso de la cinta indicadora, se utilizó en cada proceso de esterilización, el cual fue eficiente, ya que dicha cinta presentó el cambio de color, lo que indica efectividad en el proceso.

En cuanto al empleo de las ampollas Sterikon plus Bioindicador, de acuerdo a lo estipulado por el laboratorio, se usaron una vez al mes en las dos autoclaves empleadas para la esterilización de material limpio y para la esterilización de material contaminado. Los resultados fueron adecuados, ya que cuando ocurre una eficiente esterilización, las esporas de *Geobacillus stearothermophilus* quedan destruidas. El color de la ampolla permanece de color rosa (Ver Figura 12). Cuando la esterilización no es eficiente, la ampolla vira de color rosa al amarillo.

**Figura 12.** Ampolla Sterikon plus Bioindicador luego del proceso de esterilización



Fuente: Autor

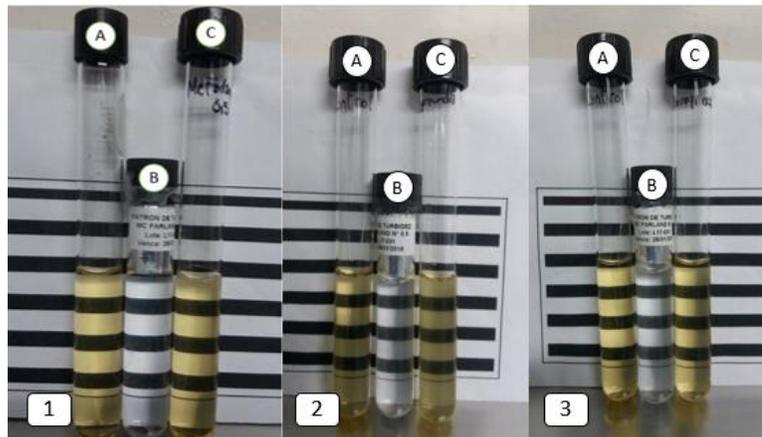
## 6.6 Validación del método de filtración por membrana para detección de Coliformes Totales, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*

### 6.6.1 Estandarización del inóculo y técnica de Filtración por Membrana

A partir de las cepas activadas, se realizó la preparación del Patrón McFarland de 0,5 como se muestra en la Figura 13. Para la preparación del Patrón empleado para las tres cepas en los diferentes ensayos, se partió del crecimiento de una colonia de aproximadamente 18 a 24 horas de incubación y posteriormente se transfirió a caldo BHI incubando el tubo durante 60 minutos a  $35 \pm 2$  °C.

La evaluación de la concentración de la cepa se evaluó por turbidez en comparación con el patrón comercial.

**Figura 13.** Preparación Patrón McFarland. A: Control Caldo BHI. B: Patrón McFarland 0,5 comercial. C: Patrón preparado a partir de una colonia de cada microorganismo. *Escherichia coli* (1). *Citrobacter freundii* (2). *Pseudomonas aeruginosa* (3)



Fuente: Autor

Para llevar a cabo el primer procedimiento de filtración, en el caso de todas las cepas, se realizaron diluciones seriadas a partir del McFarland preparado hasta  $10^{-7}$ . Se inoculó 1 mL de las diluciones en 99 mL de Agua Destilada Estéril (ADE) y seguidamente, se filtró cada una de las muestras. Los resultados se muestran en la Tabla 4. Así mismo, en la Figura 14 se muestra el crecimiento de las cepas en el primer ensayo de filtración.

**Tabla 4.** Resultados obtenidos a partir del ensayo de filtración de las cepas analizadas de las diluciones de  $10^{-2}$  a  $10^{-7}$

Cepa	Dilución	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$	Promedio	Desviación estándar	Coefficiente de variación
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	UFC/100 mL	TNTC	TNTC	TNTC	214	36	8	1,5966	0,7145	0,448
	Log <sub>10</sub>	N/A	N/A	N/A	2,330	1,556	0,903			
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 43864	UFC/100 mL	TNTC	TNTC	TNTC	148	16	3	1,2838	0,8494	0,662
	Log <sub>10</sub>	N/A	N/A	N/A	2,170	1,204	0,477			
	UFC/100 mL	TNTC	TNTC	TNTC	144	12	1	1,0792	1,0792	1,000
	Log <sub>10</sub>	N/A	N/A	N/A	2,158	1,079	0,000			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	UFC/100 mL	TNTC	TNTC	TNTC	120	34	3	1,3626	0,8143	0,598
	Log <sub>10</sub>	N/A	N/A	N/A	2,079	1,531	0,477			

TNTC: Too Numerous To Count (Muy numeroso para contar).

N/A: No Aplica

Fuente: Autor

**Figura 14.** Crecimiento de las cepas producto del primer ensayo de filtración. A: *Escherichia coli* ATCC 8739. B: *Citrobacter freundii* ATCC 43864. C: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027



Fuente: Autor

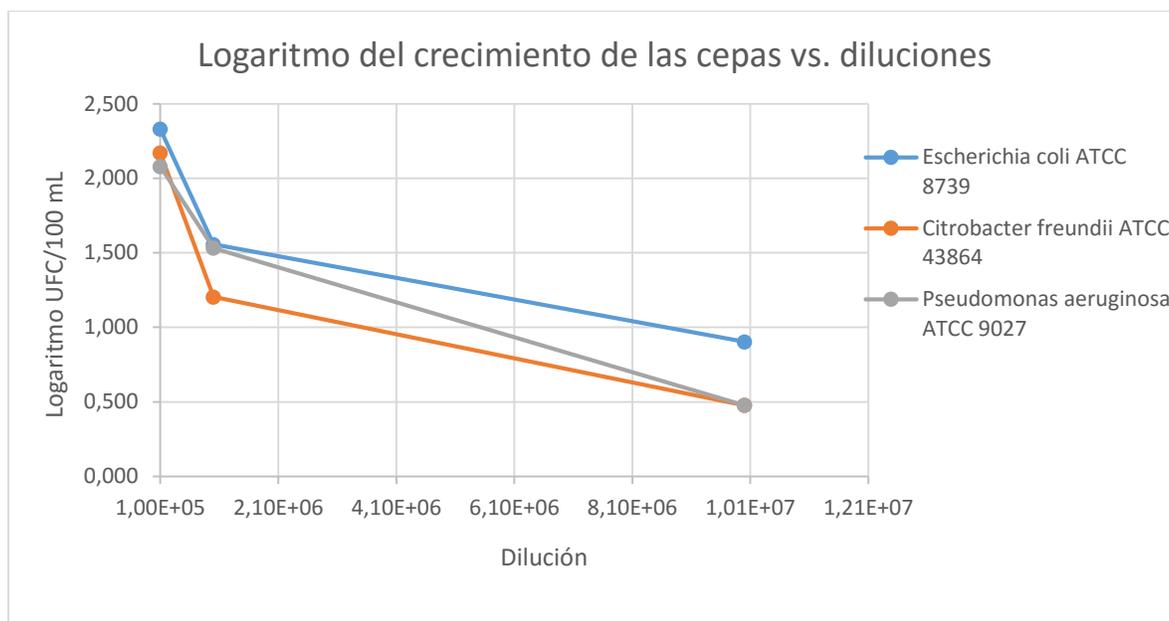
De acuerdo a los resultados mostrados en la Tabla 4, las concentraciones que se seleccionaron para los ensayos fueron  $10^{-6}$  y  $10^{-7}$ , dado que concentraciones más altas pueden ocasionar un solapamiento de las colonias, ocasionando datos inciertos.

Para determinar la linealidad de las cepas de trabajo, en base a los resultados obtenidos en la Tabla 4, se muestra la Figura 15 en la que se presenta el comportamiento del logaritmo del recuento de los microorganismos en las diluciones  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  y  $10^{-7}$ .

Como se evidencia en la Figura 15, el microorganismo que mejor presentó linealidad de los datos es *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 en comparación a los otros dos microorganismos. Sin embargo, no se descarta que las tres cepas se comportan de forma lineal, ya que como se muestra en la Tabla 4, en cada dilución ocurre la disminución de la concentración de cada cepa en una unidad logarítmica.

A partir de lo anterior, se infiere que los tres microorganismos cumplen con el parámetro de linealidad y por tanto el método evaluado para la detección de coliformes totales, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* en agua, es exacto y preciso.

**Figura 15.** Linealidad del método de filtración por membrana



Fuente: Autor

### 6.6.2 Repetibilidad y Reproducibilidad

De acuerdo a los resultados obtenidos en el primer ensayo de filtración, se realizaron los ensayos de repetibilidad, para lo cual se tuvo en cuenta las diluciones  $10^{-6}$  y  $10^{-7}$ . Los resultados se muestran en la Tabla 5, para *E. coli* ATCC 8739; Tabla 6, para *C. freundii* ATCC 43864; y Tabla 7, para *P. aeruginosa* ATCC 9027.

Los ensayos de repetibilidad se realizaron bajo las mismas condiciones en la manipulación de cada una de las cepas. Para el caso de los ensayos de reproducibilidad, fueron realizados por diferente analista.

Se realizaron 8 ensayos para el caso de la repetibilidad y para la reproducibilidad se realizaron dos, todos trabajando las concentraciones de  $10^{-6}$  y  $10^{-7}$  donde se encontraron los valores de mejor cuantificación.

**Tabla 5.** Recuento obtenido a partir de los ensayos realizados para la prueba de repetibilidad de la filtración de *E. coli* ATCC 8739 en base a las diluciones  $10^{-6}$  y  $10^{-7}$  del Patrón McFarland 0,5

Tiempo	Dilución	Ens 1	Ens 2	Ens 3	Ens 4	Ens 5	Ens 6	Ens 7	Ens 8	Promedio	Desviación estándar	Coficiente de variación
<b>24 horas</b>	$10^{-6}$	35	33	37	34	39	29	30	32	1,525	0,0436	0,0286
	Log <sub>10</sub>	1,544	1,519	1,568	1,531	1,591	1,462	1,477	1,505			
<b>48 horas</b>	$10^{-6}$	35	33	37	34	39	29	30	32	1,525	0,0436	0,0286
	Log <sub>10</sub>	1,544	1,519	1,568	1,531	1,591	1,462	1,477	1,505			
<b>24 horas</b>	$10^{-7}$	6	5	4	8	9	9	7	4	0,792	0,1458	0,1840
	Log <sub>10</sub>	0,778	0,699	0,602	0,903	0,954	0,954	0,845	0,602			
<b>48 horas</b>	$10^{-7}$	6	5	4	8	9	9	7	4	0,792	0,1458	0,1840
	Log <sub>10</sub>	0,778	0,699	0,602	0,903	0,954	0,954	0,845	0,602			

Fuente: Autor

**Tabla 6.** Recuento obtenido a partir de los ensayos realizados para la prueba de repetibilidad de la filtración de *C. freundii* ATCC 43864 en base a las diluciones  $10^{-6}$  y  $10^{-7}$  del Patrón McFarland 0,5

Tiempo	Dilución	Ens 1	Ens 2	Ens 3	Ens 4	Ens 5	Ens 6	Ens 7	Ens 8	Promedio	Desviación estándar	Coficiente de variación
<b>24 horas</b>	$10^{-6}$	16	13	19	15	21	13	14	21	1,210	0,0875	0,0724
	Log <sub>10</sub>	1,204	1,114	1,279	1,176	1,322	1,114	1,146	1,322			
<b>48 horas</b>	$10^{-6}$	16	13	19	15	21	13	14	21	1,210	0,0875	0,0724
	Log <sub>10</sub>	1,204	1,114	1,279	1,176	1,322	1,114	1,146	1,322			
<b>24 horas</b>	$10^{-7}$	1	2	4	2	2	2	3	3	0,345	0,1804	0,5228
	Log <sub>10</sub>	0,000	0,301	0,602	0,301	0,301	0,301	0,477	0,477			
<b>48 horas</b>	$10^{-7}$	1	2	4	2	2	2	3	3	0,345	0,1804	0,5228
	Log <sub>10</sub>	0,000	0,301	0,602	0,301	0,301	0,301	0,477	0,477			

Fuente: Autor

**Tabla 7.** Recuento obtenido a partir de los ensayos realizados para la prueba de repetibilidad de la filtración de *P. aeruginosa* ATCC 9027 en base a las diluciones  $10^{-6}$  y  $10^{-7}$  del Patrón McFarland 0,5

Tiempo	Dilución	Ens 1	Ens 2	Ens 3	Ens 4	Ens 5	Ens 6	Ens 7	Ens 8	Promedio	Desviación estándar	Coefficiente de variación
<b>24 horas</b>	$10^{-6}$	33	33	29	35	36	29	30	33	1,507	0,0360	0,0239
	Log <sub>10</sub>	1,519	1,519	1,462	1,544	1,556	1,462	1,477	1,519			
<b>48 horas</b>	$10^{-6}$	33	33	29	35	36	29	30	33	1,507	0,0360	0,0239
	Log <sub>10</sub>	1,519	1,519	1,462	1,544	1,556	1,462	1,477	1,519			
<b>24 horas</b>	$10^{-7}$	1	1	4	1	3	4	4	3	0,345	0,2904	0,8415
	Log <sub>10</sub>	0,000	0,000	0,602	0,000	0,477	0,602	0,602	0,477			
<b>48 horas</b>	$10^{-7}$	1	1	4	1	3	4	4	3	0,345	0,2904	0,8415
	Log <sub>10</sub>	0,000	0,000	0,602	0,000	0,477	0,602	0,602	0,477			

Fuente: Autor

Para comprobar que el método cumple con los parámetros de repetibilidad, se empleó un análisis estadístico basado en la distribución de t- Student en la Hoja de Cálculo Microsoft Excel, para lo cual, se manejó una distribución de dos colas, con un índice de confianza del 95 % y una significancia de 0,05, es decir, cada cola con un 0,025. Los grados de libertad de los análisis es de 7 que obedece al valor de la población menos 1.

Se planteó un contraste de hipótesis, para lo cual se estableció:

Hipótesis nula (H<sub>0</sub>): El promedio de los datos obtenidos de los ensayos de repetibilidad se encuentran dentro del nivel de confianza del 95 % respecto al promedio obtenido del primer ensayo de filtración para las diluciones 10<sup>-6</sup> y 10<sup>-7</sup> para las tres cepas estudiadas.

Hipótesis alterna (H<sub>1</sub>): Los datos obtenidos en los ensayos de repetibilidad se encuentran fuera del índice de confianza establecido para las tres cepas en estudio.

Para el análisis de distribución de t – Student, se calculó el t valor para compararlo con el valor t tabulado y así establecer si se acepta o se rechaza la hipótesis establecida. En la Tabla 8, se muestra el valor t calculado junto con el valor t de la tabla de distribución.

**Tabla 8.** Valor t calculado a partir de los análisis de repetibilidad

<b>Microorganismo</b>	<b>Dilución</b>	<b>Valor calculado</b>	<b>t</b>	<b>Valor t tabulado</b>
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	10 <sup>-6</sup>	-2,029		2,3646
	10 <sup>-7</sup>	-2,149		
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 43864	10 <sup>-6</sup>	2,203		
	10 <sup>-7</sup>	1,671		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	10 <sup>-6</sup>	-1,867		
	10 <sup>-7</sup>	-1,285		

Fuente: Autor

De acuerdo con la Tabla 8, se aceptan todas las hipótesis establecidas, dado que los resultados de valor t calculado, se encuentran dentro del índice de confianza con una significancia del 0,05.

En cuanto a los ensayos de reproducibilidad, se basaron en la realización de la técnica por un analista diferente. Los resultados se presentan en la Tabla 9.

**Tabla 9.** Resultados obtenidos de los ensayos de reproducibilidad de la técnica de filtración por membrana

Cepa	Ens	10 <sup>-6</sup>	Log <sub>10</sub>	Prom	Desviación estándar	10 <sup>-7</sup>	Log <sub>10</sub>	Prom	Desviación estándar
<b><i>Escherichia coli</i> ATCC 8739</b>	1	44	1,643	1,6173	0,0370	4	0,6021	0,4515	0,2129
	2	39	1,591			2	0,3010		
<b><i>Citrobacter freundii</i> ATCC 43864</b>	1	24	1,38	1,4427	0,0883	5	0,6990	0,5880	0,1569
	2	32	1,505			3	0,4771		

Fuente: Autor

Para determinar si la técnica es reproducible, se realizó un contraste de hipótesis, estableciendo:

Hipótesis nula (H<sub>0</sub>): El método presenta resultados estadísticamente similares cuando se realiza por dos diferentes analistas sin ocurrir una variación considerable de los datos.

Hipótesis alterna (H<sub>1</sub>): Los resultados obtenidos a partir de la técnica van a depender del analista que los ejecute presentando una variación considerable entre los datos.

De acuerdo a la distribución t – Student para el análisis de la reproducibilidad, sólo fue posible realizar dos ensayos por cada dilución para cada cepa. Sin embargo, el análisis estadístico que se realizó establece que en la hipótesis planteada se acepta, dado que los valores t calculados se encuentran dentro del índice de confiabilidad del 95 % cuando se realiza el análisis con un grado de libertad y una significancia del 0,05. En la Tabla 10, se muestran dichos valores.

**Tabla 10.** Valor t calculado en comparación del valor t tabulado para el análisis de hipótesis de las dos cepas en las dos diluciones estudiadas

Microorganismo	Dilución	Valor calculado	t	Valor t tabulado
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	10 <sup>-6</sup>	2,299	12,7062	
	10 <sup>-7</sup>	-2,909		
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 43864	10 <sup>-6</sup>	4,821		
	10 <sup>-7</sup>	3,151		

Fuente: Autor

Para los dos casos, de repetibilidad y reproducibilidad ejecutados, se acepta la hipótesis nula que se establece. Por tanto, se permite afirmar que el método de filtración por membrana para la detección de coliformes totales, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* para el análisis de las aguas tratadas en la Pasteurizadora Santo Domingo S.A es confiable y reproducible, lo que determina que el método es a su vez preciso.

Respecto al análisis de la robustez del método, en todos los casos, tal como se muestra en las Tablas 5, 6 y 7, no aumentó el número de colonias en función al tiempo de incubación de las 24 a las 48 horas a  $35 \pm 2$  °C.

Por tanto, se infiere que el método es robusto. Sin embargo, se presentó aumento del tamaño de las colonias pasadas las 24 horas de incubación, por lo cual puede ocurrir solapamiento de las colonias en caso tal que la carga microbiana sea muy alta (Ospino, 2013). Por tanto, aunque el método es robusto, se recomienda realizar la lectura de las muestras que se analicen a las 24 horas de su incubación.

Para establecer la precisión del método, por un lado, hay que definir la repetibilidad como la medida bajo la cual se puede evaluar la cercanía existente entre los datos teniendo en cuenta que se manejan las mismas condiciones de análisis (mismo analista, mismos equipos, mismos reactivos, mismos instrumentos); mientras que, por otro lado, respecto a la reproducibilidad, se evalúa el ensayo bajo parámetros diferentes. Además, la precisión, también establece la concordancia del método en función de los datos cuando este se realiza en repetidas ocasiones bajo los mismos criterios y bajo criterios diferentes. Para ello, también se determinó los valores de medias, desviaciones estándar y coeficientes de variación en cada ensayo; y por medio de estos valores se logró evidenciar que los resultados presentan poca dispersión respecto a la media, ya que los valores de desviación son bajos y esto permite establecer que los datos presentan homogeneidad entre sí.

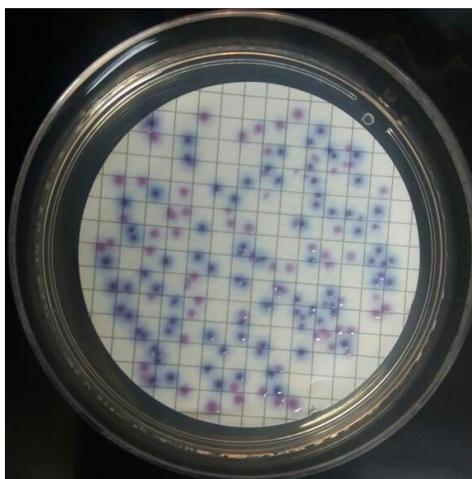
Respecto a los ensayos de reproducibilidad para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, no se ejecutaron debido a que sólo se contaba con una analista del laboratorio de microbiología de la empresa.

### **6.6.3 Preparación de un pool de *Escherichia coli* ATCC 8739 y *Citrobacter freundii* ATCC 43864**

Respecto al ensayo del pool de *Escherichia coli* ATCC 8739 y *Citrobacter freundii* ATCC 43864, el ensayo se realizó con el fin de diferenciar el crecimiento de los dos microorganismos en el medio de cultivo. La Figura 16 muestra el crecimiento obtenido a partir de la muestra filtrada.

Dicho ensayo se realizó de forma cualitativa, de tal modo que se desconoce la concentración de los microorganismos en la muestra.

**Figura 16.** Colonias de *Escherichia coli* ATCC 8739 y *Citrobacter freundii* ATCC 43864 producto de la filtración de una muestra con un pool de los dos microorganismos



Fuente: Autor

Como se muestra en la Figura 16, se logra observar el crecimiento de los dos microorganismos evaluados en Agar Chromocult. Por un lado, las colonias de *Escherichia coli* ATCC 8739 de color azul – violeta; y las colonias de *Citrobacter freundii* ATCC 43864 de color rojo. Esto permite establecer que el medio de cultivo favorece a la diferencialidad del grupo de los coliformes totales y los coliformes fecales contribuyendo a su vez a obtener resultados confiables y certeros cuando se presentan estos dos microorganismos en una muestra de agua.

#### **6.6.4 Prueba en una matriz de agua potable y control negativo**

En cuanto a las muestras de agua potable filtradas, se realizó con el fin de determinar el comportamiento de los microorganismos en la matriz en la cual se realizó el ensayo de la técnica validada simulando a su vez las condiciones que tiene una muestra de agua potable. De los análisis realizados, la Tabla 11 plantea los recuentos obtenidos de los ensayos, los cuales se realizaron por duplicado.

**Tabla 11.** Resultado de crecimiento evidenciado de la filtración de las muestras de agua potable con las cepas inoculadas

Microorganismo	Ens	10 <sup>-6</sup>	Log <sub>10</sub>	Prom	Desv Est	10 <sup>-7</sup>	Log <sub>10</sub>	Prom	Desv Est
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	1	36	1,55	1,59	0,0566	9	0,95	0,895	0,0778
	2	43	1,63			7	0,84		
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 43864	1	38	1,57	1,515	0,0778	8	0,90	0,795	0,1485
	2	29	1,46			5	0,69		
Pool de los dos microorganismos	1	47	1,67	1,63	0,0566	9	0,95	0,925	0,0354
	2	39	1,59			8	0,90		

Fuente: Autor

Por otro lado, se evaluaron las características fisicoquímicas de la muestra de agua potable empleada para la filtración, los resultados se muestran en la Tabla 12.

**Tabla 12.** Resultados de las características fisicoquímicas del agua potable empleada para el proceso de filtración

Análisis	Resultado
pH	7,44
Cloro	0,5 ppm
Dureza	60 mg CaCO <sub>3</sub> /L

Fuente: Autor

En cuanto a la Tabla 12, los resultados obtenidos para los análisis fisicoquímicos de la matriz en la cual se llevó a cabo los ensayos, muestra que dichos parámetros se encuentran dentro de los lineamientos establecidos por el laboratorio de control de calidad de la Pasteurizadora Santo Domingo S.A.

Respecto al control negativo, los resultados que se obtuvieron fueron óptimos dado que no se presentó crecimiento de ningún microorganismo sobre el filtro incubado en Agar Chromocult. Esto asegura que no se presentó ningún interferente en los resultados obtenidos (Ver Figura 17).

Los controles se realizaron durante todos los ensayos ejecutados en el proceso de la validación.

**Figura 17.** Controles negativos filtrados a partir de muestras de agua potable sin inocular



Fuente: Autor

### **6.7 Análisis de rutina de Pasteurizadora Santo Domingo S.A.**

Respecto a los análisis de rutina realizados en la Pasteurizadora Santo Domingo S.A., en la Tabla 13, se muestra el plan de muestreo ejecutado. Así mismo, la Tabla 14, se muestra el método empleado, el medio de cultivo y el período de incubación que se emplea para cada uno de los análisis realizados.

**Tabla 13.** Plan de muestreo realizado en Pasteurizadora Santo Domingo S.A.

<b>Tipo de muestra</b>	<b>Análisis</b>	<b>Frecuencia</b>
Leche UHT	Aerobios mesófilos	Diario
Derivado Lácteo (Bebida láctea, yogurt, kumis)	Coliformes totales y fecales, mohos y levaduras	Semanal
Leche termizada (Silos)	Aerobios mesófilos, coliformes totales y fecales	Mensual
Leche cruda (ganaderos, rutas)	Aerobios mesófilos, <i>Bacillus sporothermodurans</i>	Quincenal
Gelatina	Aerobios mesófilos, coliformes totales y fecales, mohos y levaduras, esporas de <i>Clostridium</i> spp. sulfito reductor	Trimestral
Enjuagues carros	Aerobios mesófilos, coliformes totales y fecales, unidades relativas de luz	Mensual
Enjuagues silos	Aerobios mesófilos, coliformes totales y fecales	Semanal
Insumos	Aerobios mesófilos, coliformes totales y fecales, mohos y levaduras, esporas de <i>Clostridium</i> spp. sulfito reductor, análisis fisicoquímico	Diario
Material de empaque	Aerobios mesófilos, coliformes totales y fecales, mohos y levaduras, análisis fisicoquímico	Diario
Aguas (planta UHT, planta derivados lácteos)	Aerobios mesófilos, coliformes totales y fecales, <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Mensual
Ambientes (planta UHT, planta derivados lácteos)	Aerobios mesófilos, mohos y levaduras	Mensual
Manipuladores (planta UHT, planta derivados lácteos)	Aerobios mesófilos, coliformes totales y fecales	Mensual

Fuente: Autor

**Tabla 14.** Análisis de rutina realizados en Pasteurizadora Santo Domingo con los métodos, medios de cultivo y períodos de incubación utilizados para cada uno

Análisis	Método	Medio de cultivo	Período de incubación
Aerobios mesófilos	Petrifilm	N/A	48 horas
	Análisis de esterilidad: Recuento en placa profunda	Agar BHI	
	Análisis de Agua: Filtración por membrana	Agar PC	
	Análisis de ambientes: Técnica de sedimentación	Agar PC	
Mohos y levaduras	Petrifilm	N/A	4 días
	Análisis de ambientes: Técnica de sedimentación	Agar YGC	4 días
Coliformes totales y fecales	Recuento en placa profunda	Agar VRB	48 horas
	Análisis de agua: Filtración por membrana	Agar Chromocult	24 - 48 horas
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Análisis de agua: Filtración por membrana	Agar Cetriptide	18 - 24 horas
Esporas de <i>Clostridium</i> spp. sulfito reductor	Análisis de insumos: Choque térmico a 80 °C	Agar SPS	48 horas
<i>Bacillus sporothermodurans</i>	Análisis de leche cruda y leche termizada: Choque térmico a 10 psi	Agar BHI	4 días

Fuente: Autor

A partir del plan de muestreo establecido, el equipo de analistas del laboratorio de control de calidad busca el aseguramiento y la inocuidad de los productos que allí se procesan, por tanto, se realiza un análisis minucioso de cada parámetro que influye en la elaboración del producto terminado.

De manera general, se regula y se cumple con la misión establecida por la empresa, al ofrecer a sus clientes productos de alta cantidad generando resultados oportunos y confiables empleando a su vez procedimientos normalizados y equipos calibrados y adecuados.

Así mismo, durante el desarrollo de la pasantía, se desarrolló la validación del método de detección de mohos y levaduras en Agar YGC y Agar OGY para el recuento en placa.

Para la ejecución de dicha validación, se trabajaron cepas de referencia, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 y *Candida albicans* ATCC 10231.

Se realizaron cinco ensayos de repetibilidad y cinco de reproducibilidad; la matriz evaluada fue bebida láctea fermentada elaborada por Pasteurizadora Santo Domingo S.A.

La técnica se aplicó teniendo en cuenta los parámetros estipulados por la NTC 4092, para lo cual la detección de *Candida albicans* ATCC 10231 se realizó por medio del recuento en placa profunda, mientras que para el caso de *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404, la detección se ejecutó mediante el recuento en placa profunda favoreciendo el desarrollo del micelio sobre el medio de cultivo.

Así mismo, se evaluó el crecimiento de las dos cepas en dos medios de cultivo diferente, Agar YGC y Agar OGY, para establecer cuál de los medios favorece al desarrollo de las cepas.

Los resultados obtenidos durante el período de ensayo permitieron determinar que el método es confiable y reproducible para el análisis de este tipo de microorganismos. También, en cuanto a la evaluación de los medios de cultivo, para el caso del moho, fue el Agar YGC quien permitió un mejor crecimiento de la cepa a diferencia del Agar OGY teniendo en cuenta que bajo las mismas condiciones de incubación en tiempo y temperatura, el crecimiento en el medio de cultivo OGY fue más lento.

## 7. CONCLUSIONES

Se estableció que el método de filtración por membrana para la detección de coliformes totales (*Citrobacter freundii*), *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* en aguas empleadas en Pasteurizadora Santo Domingo S.A. es preciso, exacto, confiable y reproducible; ya que los resultados de la prueba t - Student no mostraron diferencias significativas en los promedios de los ensayos de repetibilidad y reproducibilidad para estos grupos microbianos con un nivel de confiabilidad del 95%.

Se logró verificar que Agar Chromocult presenta una adecuada diferencialidad y selectividad para el crecimiento y desarrollo de microorganismos del grupo de los coliformes inhibiendo a su vez posibles microorganismos Gram positivos interferentes.

Los resultados obtenidos a partir del ensayo de filtración por membrana, no dependen del analista que ejecuta el método. Así mismo, los resultados no influyen respecto al período de incubación puesto que se obtuvo el mismo crecimiento de los microorganismos a las 24 y 48 horas de incubación y por ende el método es robusto.

Se estipula que las concentraciones empleadas para la ejecución de los análisis de  $10^{-6}$ : 38 UFC y  $10^{-7}$ : 8 UFC, permiten obtener una concentración adecuada del inóculo y de este modo favorecer la lectura de los resultados durante los ensayos.

Se verificó el crecimiento de las cepas de referencia en una matriz de agua potable, comprobando que los resultados de dicho crecimiento fueron óptimos y los microorganismos crecieron adecuadamente. Así mismo, en el control negativo no se detectó la presencia de microorganismos en agua potable, lo que permite garantizar que el agua empleada en Pasteurizadora Santo Domingo S.A. cumple con los parámetros de calidad.

## 8. RECOMENDACIONES

Se recomienda la ejecución de los análisis no sólo en muestras de agua potable; también puede trabajarse muestras de agua envasada o aguas naturales para dar mayor veracidad al método.

Como se menciona en la de reproducibilidad de la técnica, sólo se ejecutaron dos ensayos; por ende, se recomienda que dichos ensayos se realicen un mayor número de veces para obtener una mejor confiabilidad en los resultados, ya que al aumentar la reproducibilidad de los ensayos se disminuye el error experimental, lo que permitiría obtener una mayor confiabilidad en los resultados finales de la validación. También, se debe realizar el ensayo para todas las cepas validadas, ya que en este caso no se ejecutó la reproducibilidad de *P. aeruginosa*.

De acuerdo al análisis estadístico, al validar tres cepas, se recomienda realizar un análisis de varianza de una vía (ANOVA) para corroborar la certeza de los resultados, una vez se haya incrementado la repetibilidad de los análisis.

Es importante que la persona que realice esta validación, haga una excelente revisión del estado del arte, donde se adquiera el conocimiento y la destreza para la realización de los ensayos y la validación de la técnica.

## 9. GLOSARIO

**DIFERENCIALIDAD:** Capacidad de un medio de cultivo para distinguir dos microorganismos diferentes de acuerdo a los componentes del medio que ocasionan la expresión de un comportamiento metabólico de determinado microorganismo.

**EXACTITUD:** Determina la cercanía entre el valor que es aceptado y el valor encontrado (valor promedio) obtenido al aplicar el procedimiento de análisis un cierto número de veces.

**PRECISIÓN:** Se refiere a la similitud en los resultados de dichos análisis cuando se realiza en repetidas ocasiones.

**REPETIBILIDAD:** Establece la realización de determinado ensayo bajo los mismos criterios, mismo analista, mismos equipos.

**REPRODUCIBILIDAD:** Determina la realización de un ensayo, cuando se cambia o modifica una de las variables del estudio, por ejemplo, diferentes analistas.

**ROBUSTEZ:** Capacidad que presenta un método para permanecer inalterado cuando se les realizan pequeñas variaciones a las condiciones de uso normales.

**SELECTIVIDAD:** Capacidad de un procedimiento analítico para diferenciar varias sustancias en una muestra.

**VALIDACIÓN:** Método que tiene como fin confirmar y verificar que los resultados obtenidos de un determinado ensayo son confiables y reproducibles.

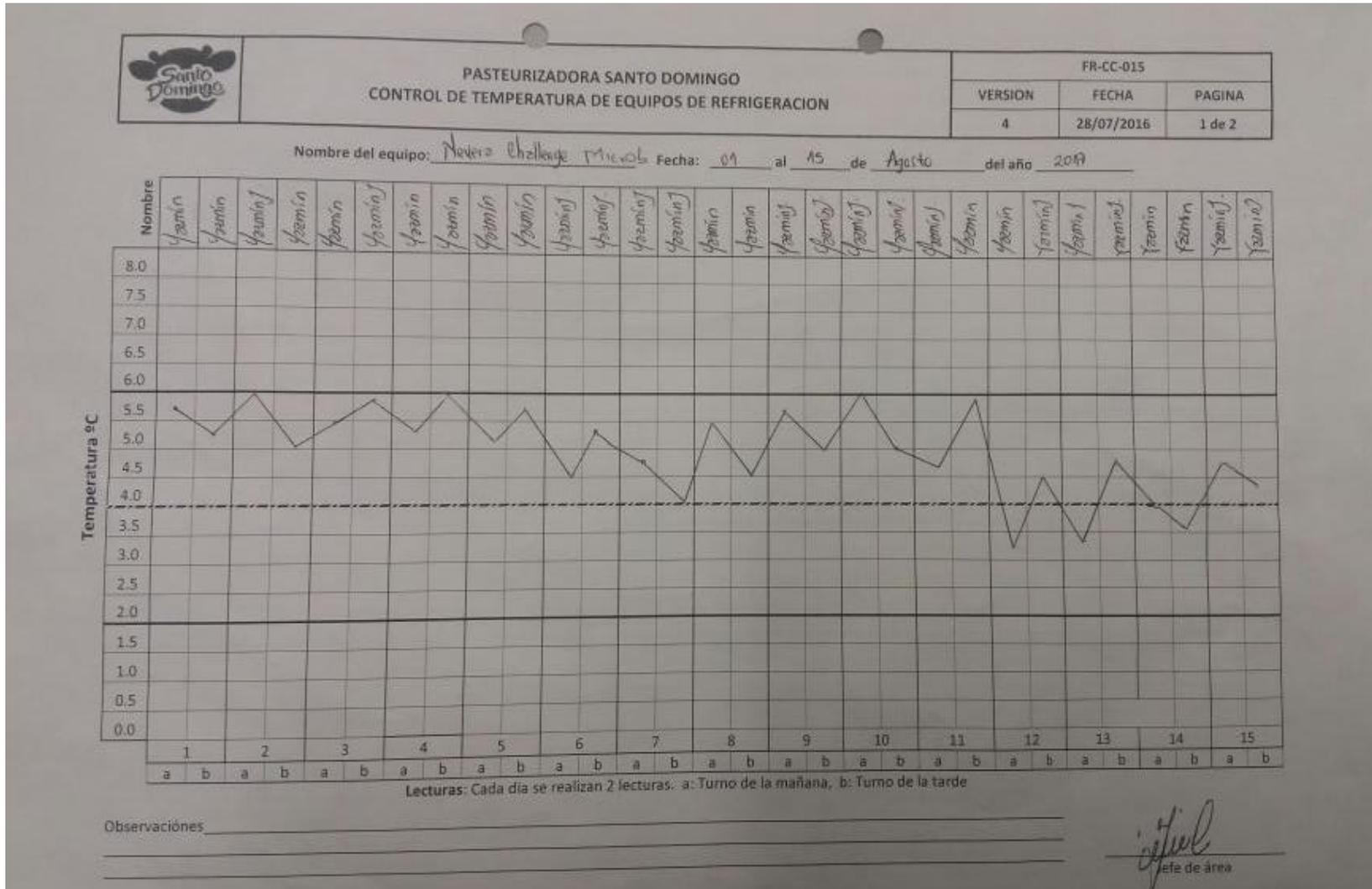
## 10. BIBLIOGRAFÍA

- APHA-AWWA-WEF - American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. 2012. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22nd Edition., E.W. Rice, R.B. Baird, A.D. Eaton, L.S. Clesceri, editors. Methods 9222 H: Simultaneous Detection of Total Coliform and *E. coli* by Dual-Chromogen Membrane Filter Procedure (Proposed). Pag. 107 – 131.
- APHA-AWWA-WEF - American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. 2012. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22nd Edition., E.W. Rice, R.B. Baird, A.D. Eaton, L.S. Clesceri, editors. Methods 9213 E: Membrane Filter Technique for *Pseudomonas aeruginosa*. Pag. 64 – 66.
- Cabrera, C. 2015. Validación del método microbiológico cilindro en placa para determinación de la potencia de neomicina en producto farmacéutico triconjugado (neomicina, clotrimazol y betametasona). Trabajo de especialización en Microbiología Industrial. Universidad Católica de Manizales, Manizales, Colombia.
- Carrillo, E., Lozano, A. 2008. Validación del método de detección de coliformes totales y fecales en agua potable utilizando Agar Chromocult. Trabajo de pregrado en Microbiología Industrial. Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- ICONTEC – Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. 2001a. Norma Técnica Colombiana NTC 5014 de 28 de noviembre de 2001. Microbiología de alimentos y alimentos para animales. Protocolo para la validación de métodos alternos. Bogotá D.C., Colombia.
- ICONTEC – Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. 2001b. Norma Técnica Colombiana NTC 4940 de 30 de mayo de 2001. Calidad del Agua. Enumeración de *Pseudomonas aeruginosa*. Técnica del número más probable, NMP. Bogotá D.C., Colombia.
- ICONTEC – Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. 2003. Guía Técnica Colombiana GTC 84 de 26 de febrero de 2003. Calidad del agua. Guía para la orientación acerca de la validación de métodos de análisis microbiológicos. Bogotá D.C., Colombia.
- ICONTEC – Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. 2005. Norma Técnica Colombiana NTC-ISO/IEC 17025 de 26 de octubre de 2005. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración. Primera actualización. Bogotá D.C., Colombia.
- ICONTEC – Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. 2007. Norma Técnica Colombiana NTC 4458 de 12 de diciembre de 2007. Microbiología de Alimentos y Alimentos para Animales. Método horizontal para el recuento de coliformes o *Escherichia coli* o ambos. Técnica de recuento de colonias utilizando medios fluorogénicos o cromogénicos. Primera actualización. Bogotá D.C., Colombia.
- ICONTEC – Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. 2008a. Guía Técnica Colombiana GTC 171 de 26 de marzo de 2009. Microbiología de

- alimentos y alimentos para animales. Guía para la preparación y producción de medios de cultivo. Guía general para los ensayos de desempeño de medios de cultivo. Bogotá D.C., Colombia.
- ICONTEC – Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. 2008b. Norma Técnica Colombiana NTC 4772 de 30 de abril de 2008. Calidad del Agua. Detección y Recuento de *Escherichia coli* y de bacterias coliformes. Parte 1: Método de Filtración por Membrana. Primera actualización. Bogotá D.C., Colombia.
- ICONTEC – Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. 2009a. Norma Técnica Colombiana NTC 5699 de 19 de agosto de 2009. Aseguramiento de la Calidad – Control de la calidad en laboratorios de microbiología. Bogotá D.C., Colombia.
- ICONTEC – Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. 2009b. Norma Técnica Colombiana NTC 4092 de 16 de diciembre de 2009. Microbiología de alimentos y productos para alimentación animal. Requisitos generales y directrices para análisis microbiológicos. Bogotá D.C., Colombia.
- IDEAM – Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales. 2007. Coliformes totales y *E. coli* por el método de filtración por membrana en Agar Chromocult. Bogotá, Colombia. [En línea] [Fecha: 12 de septiembre de 2017]. Recuperado de: <http://www.ideam.gov.co/documents/14691/38155/Coliformes+totales+y+E.+coli+en+Agua+Filtraci%C3%B3n+por+Membrana.pdf/5414795c-370e-48ef-9818-ec54a0f01174>.
- Instituto de Salud Pública de Chile. 2010. Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: “Aspectos generales sobre la validación de métodos”. [En línea] [Citado el: 24 de Julio de 2017] Recuperado de: [http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento\\_tecnico/2010/12/Guia%20T%C3%A9cnica%20de%20validaci%C3%B3n%20de%20M%C3%A9todos%20y%20determinaci%C3%B3n%20de%20la%20incertidumbre%20de%20la%20medici%C3%B3n\\_1.pdf](http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento_tecnico/2010/12/Guia%20T%C3%A9cnica%20de%20validaci%C3%B3n%20de%20M%C3%A9todos%20y%20determinaci%C3%B3n%20de%20la%20incertidumbre%20de%20la%20medici%C3%B3n_1.pdf).
- Millipore, Merck. 2014. Chromocult ® agar para coliformes. Detección simultánea de bacterias coliformes y *E. coli* en agua. EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA. [En línea] [Citado el: 8 de octubre de 2017] Recuperado de: [file:///C:/Users/usuario/AppData/Local/Temp/DS4485ES00\\_Chromocult%20Coliform%20\(6-25\).pdf](file:///C:/Users/usuario/AppData/Local/Temp/DS4485ES00_Chromocult%20Coliform%20(6-25).pdf)
- Millipore. 2005. Análisis Microbiológico. Madrid, España, 2005. 48 págs.
- Ministerio de la Protección Social, Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. 2007. Resolución 2115 de 22 de junio de 2007. Por medio de la cual se señalan características, instrumentos básicos y frecuencias del sistema de control y vigilancia para la calidad del agua para consumo humano. Bogotá D.C., Colombia.
- Mossel, D.A.A., Bonants-Van, Laarhoven, T., Ligtemberg-Markus, A.M.Th., *et al.* 1983. Quality assurance of selective culture media for bacteria, moulds and yeasts: an attempt at standardization at the international level. *Journal of Applied Bacteriology*, **54**: 313 – 327.
- Ortiz, D. 2008. Validación e implementación de una metodología para el análisis microbiológico de un producto líquido preservado elaborado en una industria

- farmacéutica. Trabajo de pregrado en Microbiología Industrial. Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Ospino, G. 2013. Filtración por membrana para la detección de coliformes totales y *Escherichia coli* en aguas. Trabajo de pregrado en Microbiología. Facultad de Ciencias Básicas, Universidad de Pamplona, Pamplona, Colombia.
- Padilla, J. 2007. Validación secundaria del método de recuento en placa en superficie de *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus* en muestras de alimentos en un laboratorio de referencia. Trabajo de pregrado en Microbiología Industrial. Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Páez, L. 2008. Validación secundaria del método de filtración por membrana para la determinación de coliformes totales y *Escherichia coli* en muestras de aguas para consumo humano analizadas en el laboratorio de Salud Pública del Huila. Trabajo de pregrado en Microbiología Industrial. Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Vergara, M. 2016. Análisis microbiológico de alimentos y aguas de consumo humano en el laboratorio QC S.A.S. Trabajo de pregrado en Microbiología. Facultad de Ciencias Básicas, Universidad de Pamplona, Pamplona, Colombia.
- Villalobos, A., Calderón, L., Figueroa, C., Fierro, J., Otálora, G., et al. 2007. Evaluación por método ecométrico de agar obtenido de algas rojas colombianas. *Universitas Scientiarum*, Vol. 12, edición especial. 57 – 65.

**Anexo 11. Control de temperatura de nevera de refrigeración de las cepas de referencia**



## Anexo 12. Control de temperatura incubadora

