

VALIDACIÓN INTERNA DEL MÉTODO FILTRACIÓN POR MEMBRANA PARA LA
DETECCIÓN Y RECuento DE COLIFORMES TOTALES Y *Escherichia coli* EN
MUESTRAS DE AGUAS RESIDUALES, SUPERFICIALES Y SUBTERRÁNEAS EN
MEDIO COLINSTANT

ANGÉLICA MARIA JAIMES MORENO

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
PROGRAMA DE MICROBIOLOGIA
PAMPLONA

2018

Tabla de contenido

1.	Introducción	8
2.	Objetivos	10
2.1.	Objetivo general	10
2.2.	Objetivos específicos	10
3.	Justificación	11
4.	Marco teórico	13
4.1.	Marco legal	13
4.2.	Marco referencial	14
5.	Metodología	23
5.1.	Población de estudio	23
5.2.	Pruebas preliminares	23
5.3.	Cepas de referencia	24
5.4.	Elaboración del patrón Mcfarland	24
5.5.	Preparación y estandarización de inóculos	25
5.6.	Preparación y procesamiento de las muestras	25
5.7.	Análisis estadístico	26
5.8.	Actividades rutinarias	26
5.9.	Cronograma	27
6.	Resultados y análisis	28

6.1.	Control de ambientes, superficies y esterilidad de medios de cultivo	28
6.2.	Escala McFarland	28
6.3.	Estandarización de inóculos microbianos.....	29
6.4.	Procesamiento de las muestras	30
6.5.	Límites de detección y cuantificación	38
6.6.	Análisis de varianzas	39
6.7.	Repetibilidad.....	40
6.8.	Precisión intermedia	43
6.9.	Recuperación en matriz	45
6.10.	Criterio de precisión	47
6.11.	Rendimiento.....	48
7.	Conclusiones.....	51
8.	Bibliografía	52
9.	Anexos	54

Lista de Tablas

Tabla 1 Promedios de 10 patrones del tubo 0,5 McFarland.....	29
Tabla 2 Estandarización de la cepa <i>S.aureus</i> ATCC 6538 /ABS 0,096.....	29
Tabla 3 Estandarización de la cepa <i>Klebsiella aerogenes</i> ATCC 613048 /ABS 0,092 .	30
Tabla 4 Estandarización de la cepa <i>E. coli</i> ATCC 25922 / ABS 0,092	30
Tabla 5 Concentración de <i>E. coli</i> en muestras y estándares	31
Tabla 6 Concentración de Coliformes totales en muestras y estándares.....	31
Tabla 7 Recuento de <i>E. coli</i> en agua residual	32
Tabla 8 Recuento de Coliformes totales en agua residual	32
Tabla 9 Recuento de <i>E. coli</i> en agua superficial	33
Tabla 10 Recuento de Coliformes totales en agua superficial	33
Tabla 11 Recuento de <i>E. coli</i> en agua subterránea.....	34
Tabla 12 Recuento de Coliformes totales en agua subterránea.....	34
Tabla 13 Estándar bajo de Coliformes totales y <i>E. coli</i>	35
Tabla 14 Confirmación bioquímica de colonias presuntivas positivas y negativas	35
Tabla 15 Confirmación bioquímica de colonias presuntivas positivas y negativas	36
Tabla 16 Confirmación bioquímica de colonias presuntivas positivas y negativas	36
Tabla 17 Confirmación bioquímica de colonias presuntivas positivas y negativas	37
Tabla 18 Confirmación bioquímica de colonias presuntivas positivas y negativas	37
Tabla 19 Confirmación bioquímica de colonias presuntivas positivas y negativas	38
Tabla 20 Límite de detección y cuantificación de Coliformes totales	38
Tabla 21 Límite de detección y cuantificación de <i>E. coli</i>	39

Tabla 22 Repetibilidad para el estándar medio Coliformes totales en agua subterránea	
UFC/100mL	40
Tabla 23 Repetibilidad para el estándar alto Coliformes totales en agua subterránea	
UFC/100mL	40
Tabla 24 Repetibilidad para el estándar medio <i>E. coli</i> en agua subterránea UFC/100mL	40
Tabla 25 Repetibilidad para el estándar alto <i>E. coli</i> en agua subterránea UFC/100mL....	41
Tabla 26 Repetibilidad para el estándar medio Coliformes totales en agua residual	
UFC/100mL	41
Tabla 27 Repetibilidad para el estándar alto Coliformes totales en agua residual	
UFC/100mL	41
Tabla 28 Repetibilidad para el estándar medio <i>E. coli</i> en agua residual UFC/100mL	41
Tabla 29 Repetibilidad para el estándar alto <i>E. coli</i> en agua residual UFC/100mL	42
Tabla 30 Repetibilidad para el estándar medio Coliformes totales en agua superficial	
UFC/100mL	42
Tabla 31 Repetibilidad para el estándar alto Coliformes totales en agua superficial	
UFC/100mL	42
Tabla 32 Repetibilidad para el estándar medio <i>E. coli</i> en agua superficial UFC/100mL.	42
Tabla 33 Repetibilidad para el estándar alto <i>E. coli</i> en agua superficial UFC/100mL	43
Tabla 34 Precisión intermedia para el estándar medio Coliformes totales	43
Tabla 35 Precisión intermedia para el estándar alto Coliformes totales	44
Tabla 36 Precisión intermedia para el estándar medio <i>E. coli</i>	44
Tabla 37 Precisión intermedia para el estándar alto <i>E. coli</i>	44
Tabla 38 Agua subterránea estándar medio Coliformes totales.....	45

Tabla 39 Agua subterránea estándar alto Coliformes totales.....	45
Tabla 40 Agua subterránea estándar medio <i>E. coli</i>	45
Tabla 41 Agua subterránea estándar alto <i>E. coli</i>	45
Tabla 42 Agua residual estándar medio Coliformes totales.....	45
Tabla 43 Agua residual estándar alto Coliformes totales.....	46
Tabla 44 Agua residual estándar medio <i>E. coli</i>	46
Tabla 45 Agua residual estándar alto <i>E. coli</i>	46
Tabla 46 Agua superficial estándar medio Coliformes totales.....	46
Tabla 47 Agua superficial estándar alto Coliformes totales	46
Tabla 48 Agua superficial estándar medio <i>E. coli</i>	46
Tabla 49 Agua superficial estándar alto <i>E. coli</i>	46
Tabla 50 Criterio de precisión de <i>E. coli</i> en agua subterránea.....	47
Tabla 51 Criterio de precisión de <i>E. coli</i> en agua residual	47
Tabla 52 Criterio de precisión de <i>E. coli</i> en agua superficial	47
Tabla 53 Criterio de precisión de Coliformes totales en agua subterránea.....	48
Tabla 54 Criterio de precisión de Coliformes totales en agua residual.....	48
Tabla 55 Criterio de precisión de Coliformes totales en agua superficial	48
Tabla 56 Características de rendimiento para Coliformes totales en agua superficial.....	48
Tabla 57 Características de rendimiento para <i>E. coli</i> en agua superficial	49
Tabla 58 Características de rendimiento para Coliformes totales en agua residual.....	49
Tabla 59 Características de rendimiento para <i>E. coli</i> en agua residual	49
Tabla 60 Características de rendimiento para Coliformes totales en agua subterránea	49
Tabla 61 Características de rendimiento para <i>E. coli</i> en agua subterránea.....	50

Lista de Figuras

Figura 1 Relación de características de rendimiento.....	18
Figura 2 Equipo de filtración. Fuente el autor	20

1. Introducción

El agua es uno de los recursos naturales más abundantes en el planeta, es considerado como elemento fundamental para todo ser vivo; la humanidad le ha otorgado numerosos usos y dependiendo de estos, es utilizada en el sector agrícola, sector industrial y sector doméstico. El agua se ve afectada por la diversidad de uso a los que se puede ver sometida y dependiendo de ello se generan alteraciones físicas, químicas y microbiológicas a la misma; como resultado de todos estos procesos existen diversos tipos de agua, entre ellos las residuales, las superficiales y subterránea, entre otras, cada una con características diferentes.

Debido a su disposición, el agua tiene una gran susceptibilidad a la contaminación microbiana, pudiendo generar problemas en diferentes seres vivos; por lo tanto, surge la necesidad de realizarle análisis microbiológicos periódicamente teniendo en cuenta el tipo de agua, con el fin de determinar el grado de contaminación para evitar cualquier clase de peligro a los seres vivos.

En la actualidad existen numerosos laboratorios de análisis microbiológicos dedicados a esta labor; los cuales mediante diferentes procedimientos buscan realizar un estudio al agua con el fin de detectar microorganismos perjudiciales para la salud; para ellos existen diversas técnicas avaladas por entidades nacionales e internacionales. Una de las técnicas es la filtración por membrana que por su facilidad permite un análisis oportuno.

Todos los laboratorios deben garantizar resultados idóneos en cada uno de los análisis realizados, para esto es necesario efectuar procedimientos certificados y llevar un control continuo a cada uno

de sus protocolos. La mejor forma de asegurar que los resultados sean preciso es validar la metodología aplicada en cada uno de los análisis, con el fin de cerciorar que se estén ejecutando de manera adecuada; las validaciones permiten obtener una confiabilidad de los resultados, esta confiabilidad le otorga credibilidad a los laboratorios ante la sociedad; además es necesaria para obtener acreditación y certificación ante diversas autoridades de control; siendo estas indispensables dichas acreditaciones para poder ofrecer sus servicios a la sociedad. (AWWA-WPCF,2017.)

2. Objetivos

2.1. Objetivo general.

Validar internamente del método filtración por membrana para la detección y el recuento de Coliformes totales y *E. coli* utilizando agar colinstant en muestras de aguas residuales, superficiales y subterráneas analizadas en el laboratorio.

2.2. Objetivos específicos.

- Estandarizar las concentraciones de las cepas a detectar mediante el método filtración por membrana con las que se va a validar el método.
- Realizar un análisis estadístico a cada una de las matrices de agua para determinar si el método de filtración por membrana es viable para los estudios de las mismas.
- Determinar características de rendimiento y porcentaje de recuperación en el agar colinstant para cada una de las matrices evaluadas

3. Justificación

La acreditación es un proceso necesario para tener credibilidad y confianza en los resultados entregados por un laboratorio a sus clientes, ayudando continuamente no solo al crecimiento social de la empresa si no a la mejora del sistema de gestión de calidad de la misma.

Todo laboratorio de análisis microbiológico que se encuentre acreditado bajo la norma ISO 17025 “Requisitos generales relativos a la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración”, debe cumplir con los parámetros establecidos en ella y validar las metodologías usadas para sus análisis, con el objetivo de demostrar que son técnicamente competentes y que son capaces de generar resultados confiables.

Este laboratorio ofrece a la comunidad análisis microbiológicos de aguas, entre otros y cuenta con la acreditación de la norma ISO 17025. Debido a esto y a la necesidad de garantizar la confiabilidad de sus resultados está en la búsqueda de la acreditación por entes de control nacionales (Ideam, Ica, Ministerios de salud y Protección Social), para lo cual requiere la implementación de procedimientos validados con el fin de poder demostrar que estos se realizan de manera adecuada, y asegurar la calidad de los servicios ofrecidos.

Según la OMS “La salubridad y la calidad del agua son fundamentales para el desarrollo y el bienestar humano. Proporcionar acceso a agua salubre es uno de los instrumentos más eficaces para promover la salud y reducir la pobreza”, por lo tanto, es de vital importancia un monitoreo

constante a la calidad microbiológica la misma, con el fin de evitar que algunas enfermedades aprovechen el agua como vector para su propagación.

Actualmente el laboratorio para el análisis de aguas, ha venido utilizando el método filtración por membrana para la detección de Coliformes totales y *E. coli*; entonces es indispensable la validación de esta metodología, para garantizarle al cliente final resultados satisfactorios que sean confiables.

4. Marco teórico

4.1. Marco legal

Todo laboratorio microbiológico que preste servicios a la comunidad debe cumplir con normativas nacionales e internacionales para garantizar que sus resultados y sus procedimientos de análisis sean altamente confiables.

En Colombia se han adoptado por el Icontec diferentes normativas internacionales que permiten un excelente funcionamiento de los laboratorios de análisis microbiológicos.

El año 1905 se lanza la primera edición de Standard Methods for the examination of water and wastewater; un manual con fuentes confiables de metodología precisa y probada para el análisis de la calidad de aguas naturales, suministros de agua y aguas residuales. Hasta la fecha se han publicado 23 ediciones, en las que se han modificado y actualizado las diferentes metodologías. Todas las técnicas contenidas en este manual han sido desarrolladas por varios investigadores de calidad del agua que son miembros del Comité de Métodos Estándar (SMC). Este comité está compuesto por más de 500 personas, que se encargan de la revisión y aprobación de los métodos.

En el año 2005 se ratificó la ISO 17025, “Requisitos generales para la competencia de laboratorios de ensayo y calibración”, adoptándose como Norma Técnica Colombiana por parte del Icontec; en la cual se estipula que todo laboratorio que ha sido certificado por esta norma debe

validar los procedimientos que utilice para sus análisis con el fin de garantizar resultados confiables de acuerdo normas internacionales.

4.2. Marco referencial.

Validación. La validación de un método analítico es un paso fundamental para asegurar que los resultados entregados por dicho método sean confiables. Cuando se realiza la validación de un método por parte del laboratorio, lo que se busca es poder determinar con fundamento estadístico que el método es adecuado para los fines previstos. (Duffau B, 2010).

Los laboratorios deben validar los métodos no normalizados, los métodos que diseña o desarrolla, los métodos normalizados, así como las modificaciones de los métodos normalizados, para confirmar que los métodos son aptos para el fin estipulado, por ello es necesario llevar un registro en donde se tenga los resultados obtenidos y el procedimiento utilizado para la validación (NTC 17025).

Métodos normalizados. aquellos que fueron desarrollados por un organismo reconocido, cuyos métodos son generalmente aceptados por el sector técnico correspondiente. (Matallana A, 2015).

Métodos no normalizados. método analítico desarrollado por un tercero o que ha sido adaptado por el laboratorio a partir de un método normalizado. (Matallana A, 2015).

Métodos desarrollados por el laboratorio. aquellos que no se encuentran en normas u otras colecciones de métodos, ni en publicaciones de terceros, habiendo sido desarrollados por el propio laboratorio (Matallana A, 2015).

La validación en sus métodos de ensayo debe reflejar las condiciones reales del ensayo. Para lograr dicho propósito se pueden utilizar muestras o productos en su forma natural, o muestras inoculadas previamente con concentraciones conocidas de microorganismos (Ospino G, 2013).

Tipos de validaciones. Existen diversos tipos de validación de acuerdo al nivel.

Validación primaria. se basa en un proceso exploratorio cuyo objetivo es el establecimiento de los límites operativos y las características de funcionamiento de un método nuevo que ha sido modificado o insuficientemente caracterizado. Este tipo de validación se efectúa por medio de planes de ensayo especialmente diseñados para este fin. (Ordoñez M, 2007).

Validación secundaria. tiene lugar cuando un laboratorio pone en marcha un método desarrollado por otros. La validación secundaria tiene como objetivo principal recopilar los datos que permiten demostrar que el laboratorio es capaz de cumplir las especificaciones establecidas en la validación primaria. (Ordoñez M, 2007).

Para los fines de una validación, se utilizan normalmente ciertas mediciones estadísticas, que nos ayudan a establecer si el método se encuentra dentro de un parámetro aceptable, normalmente se determinan características de rendimiento (sensibilidad, especificidad, tasa de

falsos positivos, tasa de falsos negativos, selectividad y eficiencia), % de recuperación, repetibilidad, precisión intermedia, criterio de precisión, límite de detección y límite de cuantificación.

Extraído de Urrego Laiton, J. Confirmación de métodos microbiológicos, cuantitativos, cualitativos y estimación de la incertidumbre, 2018.

Recuperación en matriz. Se estima por el uso de cultivos de referencia adicionados a una muestra real en un rango de densidad conocido y se compara con el resultado de referencia.

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{Muestra adicionada}}{\text{Muestra sin adicionar} + \text{cultivo de referencia}} \times 100$$

La aceptación de los datos se da si se cumple el siguiente criterio:

$$\% \text{ recuperación} \geq 70\% - \leq 130\%$$

Repetibilidad. El diseño para determinar el rendimiento de repetibilidad consiste en 10 réplicas de la misma muestra que se analiza en condiciones de repetibilidad, es decir, las mismas condiciones iniciales; por el mismo analista en el mismo día, en el mismo tiempo aproximado y todas las muestras incubadas en la misma incubadora.

La existencia de una desviación estadísticamente significativa de la distribución de Poisson se puede probar aplicando el índice de dispersión de Poisson en una serie de lecturas paralelas así:

$$X^2_{r-1} = \frac{r \sum n_i^2 - (\sum n_i)^2}{\sum n_i} = \frac{r \sum n_i^2}{\sum n_i} - \sum n_i$$

El índice de dispersión de Poisson teóricamente (asintóticamente) sigue la distribución de chi-cuadrado, que permite obtener conclusiones estadísticas sobre la presencia de sobre dispersión (o baja dispersión).

Posteriormente se compara el X^2_{r-1} observado con el valor de los límites teóricos de distribución χ^2 con r-1 grados de libertad.

Posteriormente se calcula la variabilidad operativa relativa promedio corresponde al rendimiento de repetibilidad del método cuya expresión final de repetibilidad es en porcentaje.

$$U_o = \sqrt{U_o^2} * 100$$

Precisión intermedia. Se analizan 10 muestras por duplicado. Para cada muestra, las dos mediciones repetidas se realizan en condiciones intralaboratorio, con el fin de considerar el máximo variabilidad de las condiciones analíticas dentro del laboratorio.

A partir de la varianza operativa relativa promedio calculada a partir del conjunto de 10 pares se saca la raíz cuadrada la cual corresponde a la variabilidad del método observado en las condiciones de reproducibilidad intralaboratorio.

Características de rendimiento. Para las muestras en estudio se determinan cuáles son las celdas típicas y atípicas (es decir, aquellos que tienen la típica apariencia del organismo objetivo y aquellos que no tienen la apariencia típica del organismo objetivo) son contados. Ambos, celdas típicas y atípicas se identifican utilizando técnicas bioquímicas.

Número de celdas típicas identificadas como el organismo objetivo, mediante una prueba de identificación externa (verdaderos positivos).

Número de celdas atípicas identificadas como el organismo objetivo mediante una identificación externa prueba (falsos negativos).

Número de celdas atípicas identificadas como el organismo y mediante una prueba de identificación externa resultan no ser el organismo objetivo (falsos positivos).

Número de celdas atípicas identificadas como no ser el organismo objetivo mediante una identificación externa prueba (verdaderos negativos).

		Presumptive count		
		+	-	
Confirmed count	+	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a + b</i>
	-	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>c + d</i>
		<i>a + c</i>	<i>b + d</i>	<i>n</i>

Figura 1 Relación de características de rendimiento

La sensibilidad, especificidad, selectividad, tasa de falsos positivos y tasa de falsos negativos para el organismo objetivo se puede calcular de la siguiente manera:

$$\text{Sensibilidad} = a / (a + b)$$

$$\text{Especificidad} = d / (c + d)$$

$$\text{Tasa positiva falsa} = c / (a + c)$$

$$\text{Tasa negativa falsa} = b / (b + d)$$

$$\text{Selectividad} = a / n$$

$$\text{Eficiencia } E = (a + d) / n.$$

Criterio de precisión. Se debe hallar el criterio de precisión por tipo de agua. Este se halla a partir de los datos de 15 duplicados obtenidos durante la confirmación del método, siguiendo los siguientes pasos:

- Transformar en \log_{10} los datos originales de los duplicados. Si algún resultado es menor a 1, se debe sumar 1 al dato.
- Calcular la diferencia entre duplicados y convertirlos en valor absoluto.
- Sumar el total de las diferencias.
- Dividir el resultado entre el número total de datos (n).
- Multiplicar este valor por la constante de 3.27.
- El valor obtenido será el criterio de precisión empleado en las cartas de control

Filtración por membrana. La técnica de filtración por membrana permite analizar grandes volúmenes de muestra generando resultados confiables y reproducibles; gracias a este método se pueden obtener de forma fácil y rápida un estimado de una concentración de Coliformes totales y *Escherichia coli* presentes en una muestra de agua.

La muestra de agua se hace pasar mediante vacío por un filtro de celulosa de 0.45 micras de tamaño de poro, para que queden retenidas en él, las bacterias de tipo Coliformes. El filtro es colocado en un medio de cultivo específico para lo que se desea determinar en la muestra, incubando a 35 grados Celsius más o menos dos grados durante 18 a 20 horas. Se debe utilizar filtro de membrana con un diámetro de poro que permita una completa retención de las bacterias Coliformes. Se debe tener en cuenta que estos filtros estén libres de químicos susceptibles a inhibir el crecimiento y desarrollo bacteriano, que posean una velocidad de filtración satisfactoria. (Palma R, 1999).



Figura 2 Equipo de filtración. Fuente el autor

Las bacterias Coliformes son bacterias Gram negativas, no formadoras de esporas, oxidasa negativa y con forma de bastoncillo, que pueden crecer en medio aerobio y anaerobio facultativo

en presencia de sales biliares (otros agentes de superficie con propiedades inhibitoras del crecimiento similares), y que, normalmente son capaces de fermentar lactosa con producción de ácido y aldehído en 48 h cuando se incuban a una temperatura de (36 ± 2) °C. Las bacterias Coliformes poseen la enzima β -galactosidasa. (NTC 4772. 2008).

E. coli es una especie bacteriana que hace parte del grupo de los Coliformes y que son capaces de producir indol a partir de triptófano, en (21 ± 3) h a $(44,0 \pm 0,5)$ °C. También poseen la enzima β -galactosidasa, reaccionan positivamente en el ensayo del rojo de metilo y pueden decarboxilar el ácido L-glutámico, pero no son capaces de producir acetil metil carbinol, de utilizar citrato como única fuente de carbono o de crecer en un caldo de cultivo con cianuro de potasio. (NTC 4772. 2008).

Medio de cultivo Colinstant. La selectividad del medio se logra exclusivamente por la acción tensoactiva de las sales biliares N.º 3 que inhiben a la mayoría de las bacterias Gram positivas contaminantes.

La mezcla Cromogénica está constituida principalmente por dos sustancias. El 6-cloro-3-indolilb-D-galactopiranosido y el 5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-D-glucurónido. La primera de ellas es selectivamente degradada por un enzima característico de los Coliformes, la b-D-galactosidasa, provocando que la colonia de Coliformes adquiera un color que va del salmón al rojo, en función de la intensidad de la actividad enzimática.

La segunda sustancia Cromogénica es atacada por la b-D-glucuronidasa, un enzima que presentan todas las cepas de *E. coli*, de forma casi exclusiva y que libera un pigmento azulado que tiñe la colonia de tonos azules. *E. coli* posee los dos enzimas y ataca los dos sustratos Cromogénicos con lo cual la colonia se tiñe de un color azul oscuro a violáceo como resultado del acúmulo de los dos pigmentos liberados. Los Coliformes totales se consideran la suma de colonias de *E. coli* (azul oscuro violeta) más las de Coliformes (salmón-rojo).

Las otras colonias de bacterias Gram negativas aparecen incoloras, excepto algunas pocas capaces de producir glucuronidasa, que dan colonias de color azul claro a azul turquesa y que se diferencian bien de las de *E. coli* o de las Coliformes (Scharlau Microbiology, 2012)

5. Metodología

5.1. Población de estudio

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de análisis microbiológico de la ciudad de Bucaramanga, con muestras de agua superficial, subterránea y residual del laboratorio, las cuales fueron inoculadas con concentraciones conocidas de microorganismos contaminantes referenciados en la SM EDICION 23

5.2. Pruebas preliminares.

Consiste de las siguientes actividades.

Limpieza y desinfección. Cada ocho días se realizó un proceso de limpieza y desinfección a las principales áreas de trabajo (área de recuento, área de preparación de medios, cabina de flujo laminar y área de filtración) utilizando jabón neutro y un desinfectante alternativo cada semana (alcohol, hipoclorito y superprovigen).

Control de ambientes y superficies. Posterior al proceso de limpieza y desinfección, para el control de ambientes se utilizó la técnica de sedimentación, en la cual, se expusieron cajas con agar Plate Count y Rosa Bengala por 15 minutos en las áreas mencionadas anteriormente, para el control de superficies se usó la técnica del hisopado en 10 ml de agua peptonada estéril, se realizó un barrido en un área de 25 cm² en las mismas zonas del control de ambientes, posteriormente se inoculó por profundidad 1 ml a cajas de Petri adicionando agar rosa bengala, plate count y

colinstant. Los mesófilos y Coliformes fueron incubados a 37 °C por 24 horas y los mohos a temperatura ambiente por 5 días.

Control UV. Antes de realizar el montaje de cualquier tipo de muestra el equipo de filtración es expuesto a luz UV durante 20, posteriormente se realiza un barrido de la superficie del equipo con ayuda de un hisopo y se inocula por profundidad 1 ml en cajas de Petri por profundidad adicionando agar colinstant llevándose a incubar a 37°C.

Control de esterilidad de los medios de cultivo. Durante el proceso de validación se tomó una caja de medio colinstant de cada lote de preparación y se llevó a incubar a 37°C por 24 horas, pasado ese tiempo se verifico que no hubiera ningún tipo de crecimiento microbiano.

Método ecométrico. Se evaluó la productividad y selectividad del medio Colinstan en cada lote preparado. Se escogió una caja de Petri y se dividió en cuatro cuadrantes, para evaluar la selectividad se tomó una azada de un microorganismo interferente (*S. aureus*) y se trazaron 5 estrías paralelas en cada cuadrante y una estría central, para evaluar la productividad se realiza el mismo procedimiento con un microorganismo adecuado para el medio (*E. coli*), se llevan a incubar las cajas por 24 horas a 37° C, pasado este tiempo se realiza la lectura en el anexo 1 se puede observar el formato utilizado para la lectura.

5.3. Cepas de referencia

Se utilizaron 3 cepas de referencias provenientes del cerapio del laboratorio las cuales fueron: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (control negativo), *Klebsiella aerogenes* ATCC 13048 y *E. coli* ATCC 25922, se realizó la reactivación a cada una de las cepas siguiendo las especificaciones de la casa comercial (Microbiologics).

5.4. Elaboración del patrón Mcfarland

Se preparó el patrón Mcfarland 0,5 adicionando 0,05 ml de BaCl₂ (0,048 M) a 9,95 ml de H₂SO₄ (0,18 M) y se llevó a espectrofotometría, se tomó 1 ml y se dispuso en una celda de cuarzo y se midió la absorbancia a 625 nm. Se realizaron 10 mediciones del mismo patrón.

5.5. Preparación y estandarización de inóculos

Cada uno de los microorganismos usados fueron inoculados en cajas de agar nutritivo a 37°C, pasadas 18 horas de crecimiento se tomó una colonia de cada uno y se realizó una suspensión bacteriana en 9 ml de agua destilada estéril, se comparó la turbidez con el tubo N° 0,5 del patrón Mcfarland el cual estima teóricamente una población aproximada de $1,5 \times 10^8$ células/ml, posteriormente se tomó 1 ml de cada suspensión y se leyó la absorbancia a 625 nm, seguidamente se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-8} , tomando 1 ml de cada suspensión y transfiriéndolo a 9 ml de agua destilada sucesivamente, se sembró en profundidad 1 ml de cada dilución por triplicado en agar nutritivo, se llevó a incubar por 24 horas a 37°C, pasado este tiempo se realizó el recuento con el fin de establecer un inóculo alto (100-1000 UFC), uno medio (10-100 UFC) y uno bajo (1-10 UFC), los cuales se utilizarían en el proceso de validación.

5.6. Preparación y procesamiento de las muestras

Se escogieron tres muestras de agua (una subterránea, una superficial y una residual) provenientes de clientes del laboratorio, cada una por aparte fue diluida hasta obtener una concentración de *E. coli* y Coliformes totales fácilmente cuantificable, siendo esta dilución la muestra a trabajar, posteriormente se prepararon los estándares alto y medio de cada

microorganismo, de los cuales se tomó 1 ml y se le adicionó a 100 ml de la muestra diluida, de igual forma se preparó un estándar bajo con una concentración aproximada de 3 UFC/ml de *E coli* y Coliformes totales, posteriormente dos analistas procedieron a filtrar 15 veces cada muestra como lo establece el procedimiento de filtración por membrana de la Standard Methods for the examination of water and wastewater. Método 9222 J. 23rd edition, seguidamente se llevó a incubar por 24 horas a 37°C, pasado este tiempo se realizó la lectura correspondiente y se inició la confirmación bioquímica de los microorganismos en estudio

5.7. Análisis estadístico

Después de recolectar todos los datos para cada una de las tres muestras de agua se procedió a realizar el análisis de varianza unifactorial de medidas repetidas (ANOVA), para determinar la existencia o no de diferencias significativas entre los resultados obtenidos por cada analista con un intervalo de confianza del 95% ($p < 0,05$) utilizando el test de Tukey, y empleando el programa informático Excel.

5.8. Actividades rutinarias

Diariamente en el laboratorio se desarrollan diferentes actividades que hacen parte de la rutina del mismo, normalmente se hacen análisis de alimentos, superficies ambientes y manipuladores, análisis de aguas por las técnicas filtración por membrana y número más probable, lectura y recuento de las muestras estudiadas y emisión de resultados.

5.9. Cronograma

CRONOGRAMA

Actividad /Semana	Agosto				Septiembre				Octubre				Noviembre			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Inicio pasantía	■															
Inducción		■														
Actividades rutinarias del laboratorios *			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Limpieza y desinfección			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Control de ambientes y superficies			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Elaboración del patrón Mcfarland			■	■												
Estandarización de los inóculos			■	■												
Estandarización de la técnica filtración por membrana			■	■												
Filtración muestra agua residual con adición del estándar alto y estándar medio, confirmación bioquímica					■	■	■									
Filtración muestra agua subterránea con adición del estándar alto y estándar medio, confirmación bioquímica									■	■	■					
Filtración muestra agua superficial con adición del estándar alto y estándar medio, confirmación bioquímica													■	■	■	
Análisis estadístico													■	■	■	
Elaboración de informe					■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Entrega de informe																■

*montaje de muestras de alimentos, montajes de muestras de agua por filtración por membrana o NMP, lectura de resultado

Figura 3. Cronograma de actividades. Fuente el autor

6. Resultados y análisis

6.1. Control de ambientes, superficies y esterilidad de medios de cultivo

Cada ocho días se realizaron controles con el fin de inspeccionar los ambientes y las superficies en donde se llevaron a cabo los procesos de validación, rara vez se obtuvo crecimiento de hongos y los escasos crecimientos bacterianos no generaban interferencia en los análisis hechos, por lo que se puede establecer que el laboratorio cuenta con un proceso adecuado de limpieza y desinfección. La esterilidad de los medios de cultivo trabajados fue óptima puesto que no se obtuvo crecimiento microbiano al realizarle la prueba de esterilidad a cada lote de medio de cultivo colinstant preparado.

6.2. Escala McFarland

Inicialmente se eligió el patrón McFarland 0,5 para la estandarización de los inóculos, se prepararon 10 patrones y se tomó la absorbancia a cada uno de ellos en el espectrofotómetro; los resultados arrojados concordaron con el rango establecido teóricamente obteniendo un promedio de 0,084, este resultado permite utilizar este patrón como referente para la elaboración de los inóculos microbianos. (tabla 1).

Tabla 1 Promedios de 10 patrones del tubo 0,5 McFarland

Repeticiones	Absorbancia
1	0,080
2	0,079
3	0,086
4	0,071
5	0,092
6	0,080
7	0,087
8	0,085
9	0,094
10	0,084
Promedio	0,084

6.3. Estandarización de inóculos microbianos

En las siguientes tablas se observan los recuentos por triplicado que se obtuvieron en la estandarización de los inóculos de *S. aureus* ATCC 6538, *Klebsiella aerogenes* ATCC 613048, *E. coli* ATCC 25922 respectivamente. De acuerdo con los resultados obtenidos del comportamiento de las tres cepas trabajadas se pudo establecer que la dilución 10^{-6} se utiliza como estándar alto y la dilución 10^{-7} como estándar medio puesto que están en rangos cuantificables y permiten un recuento adecuado (tablas 2, 3, 4).

Tabla 2 Estandarización de la cepa *S.aureus* ATCC 6538 /ABS 0,096

TUBO	RECUESTO EN PLACA (UFC/mL)		
10^{-1}	TNTC	TNTC	TNTC
10^{-2}	TNTC	TNTC	TNTC
10^{-3}	TNTC	TNTC	TNTC
10^{-4}	11082	11923	11529
10^{-5}	1763	2191	1195
10^{-6}	157	161	228
10^{-7}	11	9	12
10^{-8}	5	2	0

TNTC: Too numerous to count. (demasiado numerosas para contar)

Tabla 3 Estandarización de la cepa *Klebsiella aerogenes* ATCC 613048 /ABS 0,092

TUBO	RECuento EN PLACA (UFC/mL)		
10^{-1}	TNTC	TNTC	TNTC
10^{-2}	TNTC	TNTC	TNTC
10^{-3}	TNTC	TNTC	TNTC
10^{-4}	13294	14925	20939
10^{-5}	4204	5137	3670
10^{-6}	403	678	549
10^{-7}	23	10	38
10^{-8}	0	3	1

TNTC: Too numerous to count. (Demasiado numerosas para contar)

Tabla 4 Estandarización de la cepa *E. coli* ATCC 25922 / ABS 0,092

TUBO	RECuento EN PLACA (UCF/mL)		
10^{-1}	TNTC	TNTC	TNTC
10^{-2}	TNTC	TNTC	TNTC
10^{-3}	TNTC	TNTC	TNTC
10^{-4}	14883	11924	15166
10^{-5}	3321	2559	3276
10^{-6}	429	592	621
10^{-7}	10	9	11
10^{-8}	0	1	2

TNTC: Too numerous to count. (demasiado numerosas para contar)

6.4. Procesamiento de las muestras

En las tablas 5 y 6 se especifican los resultados obtenidos de los recuentos iniciales tanto de Coliformes totales como de *E. coli* de cada una de las tres muestras antes de la inoculación con los estándares; del mismo modo se evidencian los resultados obtenidos en los recuentos de cada estándar.

Tabla 5 Concentración de *E. coli* en muestras y estándares

Muestras		
	<i>E. coli</i>	Log
Agua residual	10	1
Agua subterránea	10	1
Agua superficial	0	0
Estándares <i>E. coli</i>		
	<i>E. coli</i>	log
Estándar alto	250	2,397940009
Estándar medio	40	1,602059991

Tabla 6 Concentración de Coliformes totales en muestras y estándares

Muestras		
	Coliformes totales	Log
Agua residual	30	1,47712125
Agua subterránea	166	2,22010809
Agua superficial	80	1,90308999
Estándares Coliformes totales		
	Coliformes totales	Log
Estándar alto	150	2,176091259
Estándar medio	55	1,740362689

Las tablas que se presentan a continuación se construyeron con el recuento obtenido en el procesamiento de cada una de las tres muestras por dos analistas diferentes con la adición del estándar alto y el estándar medio.

Para el análisis estadístico de los datos se transformaron a una escala logarítmica aplicando para ello el logaritmo decimal.

Tabla 7 Recuento de *E. coli* en agua residual

ESTANDAR MEDIO				ESTANDAR ALTO			
ANALISTA 1	LOG	ANALISTA 2	LOG	ANALISTA 1	LOG	ANALISTA 2	LOG
90	1,95424251	90	1,95424251	550	2,74036269	610	2,78532984
60	1,77815125	110	2,04139269	480	2,68124124	640	2,80617997
70	1,84509804	80	1,90308999	520	2,71600334	510	2,70757018
80	1,90308999	70	1,84509804	510	2,70757018	570	2,75587486
80	1,90308999	120	2,07918125	630	2,79934055	420	2,62324929
100	2	80	1,90308999	500	2,69897	500	2,69897
90	1,95424251	50	1,69897	490	2,69019608	550	2,74036269
70	1,84509804	70	1,84509804	540	2,73239376	490	2,69019608
50	1,69897	90	1,95424251	480	2,68124124	510	2,70757018
80	1,90308999	80	1,90308999	570	2,75587486	500	2,69897
60	1,77815125	60	1,77815125	510	2,70757018	480	2,68124124
70	1,84509804	70	1,84509804	490	2,69019608	510	2,70757018
90	1,95424251	80	1,90308999	730	2,86332286	520	2,71600334
80	1,90308999	150	2,17609126	510	2,70757018	550	2,74036269
60	1,77815125	90	1,95424251	660	2,81954394	700	2,84509804

Tabla 8 Recuento de Coliformes totales en agua residual

ESTANDAR MEDIO				ESTANDAR ALTO			
ANALISTA 1	LOG	ANALISTA 2	LOG	ANALISTA 1	LOG	ANALISTA 2	LOG
150	2,17609126	150	2,17609126	780	2,8920946	1060	3,02530587
120	2,07918125	160	2,20411998	800	2,90308999	720	2,8573325
160	2,20411998	200	2,30103	850	2,92941893	810	2,90848502
180	2,25527251	180	2,25527251	940	2,97312785	830	2,91907809
250	2,39794001	160	2,20411998	690	2,83884909	980	2,99122608
170	2,23044892	170	2,23044892	830	2,91907809	790	2,89762709
160	2,20411998	210	2,32221929	750	2,87506126	830	2,91907809
180	2,25527251	290	2,462398	890	2,94939001	910	2,95904139
300	2,47712125	130	2,11394335	820	2,91381385	1030	3,01283722
170	2,23044892	190	2,2787536	850	2,92941893	860	2,93449845
210	2,32221929	170	2,23044892	790	2,89762709	950	2,97772361
190	2,2787536	160	2,20411998	810	2,90848502	840	2,92427929
340	2,53147892	180	2,25527251	1010	3,00432137	860	2,93449845
180	2,25527251	260	2,41497335	880	2,94448267	880	2,94448267
160	2,20411998	190	2,2787536	760	2,88081359	900	2,95424251

Tabla 9 Recuento de *E. coli* en agua superficial

ESTANDAR MEDIO				ESTANDAR ALTO			
ANALISTA 1	LOG	ANALISTA 2	LOG	ANALISTA 1	LOG	ANALISTA 2	LOG
70	1,84509804	50	1,69897	480	2,68124124	410	2,61278386
40	1,60205999	40	1,60205999	460	2,66275783	350	2,54406804
50	1,69897	50	1,69897	460	2,66275783	440	2,64345268
50	1,69897	60	1,77815125	440	2,64345268	470	2,67209786
30	1,47712125	30	1,47712125	430	2,63346846	510	2,70757018
50	1,69897	60	1,77815125	370	2,56820172	430	2,63346846
60	1,77815125	60	1,77815125	410	2,61278386	480	2,68124124
40	1,60205999	50	1,69897	490	2,69019608	450	2,65321251
30	1,47712125	40	1,60205999	390	2,59106461	490	2,69019608
50	1,69897	20	1,30103	450	2,65321251	450	2,65321251
40	1,60205999	50	1,69897	440	2,64345268	390	2,59106461
80	1,90308999	50	1,69897	460	2,66275783	460	2,66275783
50	1,69897	40	1,60205999	470	2,67209786	550	2,74036269
40	1,60205999	50	1,69897	520	2,71600334	470	2,67209786
20	1,30103	50	1,69897	400	2,60205999	690	2,83884909

Tabla 10 Recuento de Coliformes totales en agua superficial

ESTANDAR MEDIO				ESTANDAR ALTO			
ANALISTA 1	LOG	ANALISTA 2	LOG	ANALISTA 1	LOG	ANALISTA 2	LOG
370	2,56820172	330	2,51851394	990	2,99563519	1000	3
210	2,32221929	300	2,47712125	1010	3,00432137	920	2,96378783
440	2,64345268	270	2,43136376	1060	3,02530587	950	2,97772361
300	2,47712125	290	2,462398	970	2,98677173	870	2,93951925
330	2,51851394	320	2,50514998	940	2,97312785	930	2,96848295
490	2,69019608	390	2,59106461	990	2,99563519	910	2,95904139
360	2,5563025	460	2,66275783	1020	3,00860017	890	2,94939001
370	2,56820172	380	2,5797836	930	2,96848295	990	2,99563519
310	2,49136169	330	2,51851394	870	2,93951925	1070	3,02938378
350	2,54406804	310	2,49136169	910	2,95904139	960	2,98227123
340	2,53147892	280	2,44715803	940	2,97312785	840	2,92427929
320	2,50514998	340	2,53147892	920	2,96378783	980	2,99122608
290	2,462398	300	2,47712125	890	2,94939001	950	2,97772361
340	2,53147892	450	2,65321251	970	2,98677173	970	2,98677173
560	2,74818803	510	2,70757018	1150	3,06069784	790	2,89762709

Tabla 11 Recuento de *E. coli* en agua subterránea

ESTANDAR MEDIO				ESTANDAR ALTO			
ANALISTA 1	LOG	ANALISTA 2	LOG	ANALISTA 1	LOG	ANALISTA 2	LOG
80	1,90308999	70	1,84509804	420	2,62324929	450	2,65321251
20	1,30103	50	1,69897	460	2,66275783	450	2,65321251
70	1,84509804	60	1,77815125	480	2,68124124	400	2,60205999
40	1,60205999	30	1,47712125	330	2,51851394	480	2,68124124
20	1,30103	40	1,60205999	320	2,50514998	520	2,71600334
50	1,69897	90	1,95424251	460	2,66275783	520	2,71600334
30	1,47712125	50	1,69897	380	2,5797836	390	2,59106461
40	1,60205999	70	1,84509804	290	2,462398	400	2,60205999
60	1,77815125	60	1,77815125	350	2,54406804	580	2,76342799
60	1,77815125	80	1,90308999	590	2,77085201	490	2,69019608
80	1,90308999	50	1,69897	480	2,68124124	510	2,70757018
30	1,47712125	90	1,95424251	490	2,69019608	490	2,69019608
90	1,95424251	80	1,90308999	520	2,71600334	670	2,8260748
70	1,84509804	60	1,77815125	510	2,70757018	500	2,69897
80	1,90308999	110	2,04139269	480	2,68124124	510	2,70757018

Tabla 12 Recuento de Coliformes totales en agua subterránea

ESTANDAR MEDIO				ESTANDAR ALTO			
ANALISTA 1	LOG	ANALISTA 2	LOG	ANALISTA 1	LOG	ANALISTA 2	LOG
1730	3,2380461	1890	3,2764618	3490	3,54282543	2640	3,42160393
1890	3,2764618	2310	3,36361198	2080	3,31806333	2920	3,46538285
1900	3,2787536	1990	3,29885308	2930	3,46686762	2010	3,30319606
1720	3,23552845	1820	3,26007139	2600	3,41497335	3040	3,48287358
1520	3,18184359	1740	3,24054925	3980	3,59988307	2500	3,39794001
2080	3,31806333	1730	3,2380461	1720	3,23552845	2870	3,4578819
2010	3,30319606	1860	3,26951294	2370	3,37474835	2420	3,38381537
1940	3,28780173	1970	3,29446623	2030	3,30749604	1880	3,27415785
1690	3,2278867	2400	3,38021124	4030	3,60530505	2760	3,44090908
1930	3,28555731	1530	3,18469143	1890	3,2764618	2010	3,30319606
1730	3,2380461	1730	3,2380461	2460	3,39093511	2450	3,38916608
1820	3,26007139	1760	3,24551267	2330	3,36735592	2380	3,37657696
1970	3,29446623	1810	3,25767857	2510	3,39967372	3020	3,48000694
1770	3,24797327	1700	3,23044892	3010	3,4785665	2210	3,34439227
1810	3,25767857	1750	3,24303805	2410	3,38201704	3580	3,55388303

Tabla 13 Estándar bajo de Coliformes totales y *E. coli*

	UFC COLIFORMES TOTALES	UFC <i>E. coli</i>
1	6	2
2	4	3
3	5	1
4	6	0
5	5	2
6	6	2
7	5	2
8	7	3
9	3	2
10	4	4

Los datos de la tabla 13 fueron utilizados para establecer el límite de detección y cuantificación de cada uno de los microorganismos utilizando la técnica filtración por membrana.

Tabla 14 Confirmación bioquímica de colonias presuntivas positivas y negativas.

AGUA SUBTERRANEA. Coliformes totales					
MUESTRA	RECuento TOTAL	COLONIAS VERDADERAS POSITIVAS	COLONIAS VERDADERAS NEGATIVAS	COLONIAS FALSAS POSITIVAS	COLONIAS FALSAS NEGATIVAS
1	14	9	5	0	0
2	12	10	2	0	0
3	13	9	4	0	0
4	12	8	3	0	1
5	13	7	4	2	0
6	11	9	2	0	0
7	14	10	4	0	0
8	14	8	6	0	0
9	13	8	4	1	0
10	14	8	5	0	1
11	11	9	2	0	0
12	11	8	3	0	0
13	13	10	3	0	0
14	11	7	4	0	0
15	14	9	5	0	0

Tabla 15 Confirmación bioquímica de colonias presuntivas positivas y negativas

AGUA SUBTERRANEA <i>E. coli</i>					
MUESTRA	RECuento TOTAL	COLONIAS VERDADERAS POSITIVAS	COLONIAS VERDADERAS NEGATIVAS	COLONIAS FALSAS POSITIVAS	COLONIAS FALSAS NEGATIVAS
1	10	5	5	0	0
2	6	4	2	0	0
3	8	4	3	1	0
4	10	6	4	0	0
5	8	5	3	0	0
6	7	4	2	1	0
7	7	4	3	0	0
8	8	5	3	0	0
9	6	4	2	0	0
10	9	5	2	0	2
11	8	6	2	0	0
12	8	5	1	1	1
13	8	5	3	0	0
14	8	5	3	0	0
15	9	5	4	0	0

Tabla 16 Confirmación bioquímica de colonias presuntivas positivas y negativas

AGUA RESIDUAL. Coliformes totales					
MUESTRA	RECuento TOTAL	COLONIAS VERDADERAS POSITIVAS	COLONIAS VERDADERAS NEGATIVAS	COLONIAS FALSAS POSITIVAS	COLONIAS FALSAS NEGATIVAS
1	11	8	3	0	0
2	10	8	2	0	0
3	12	7	4	0	1
4	9	6	3	0	0
5	10	7	3	0	0
6	12	8	4	0	0
7	10	8	2	0	0
8	12	7	3	2	0
9	12	8	4	0	0
10	10	7	3	0	0
11	12	7	4	0	1
12	11	8	3	0	0
13	10	8	2	0	0
14	12	9	3	0	0
15	12	8	3	0	1

Tabla 17 Confirmación bioquímica de colonias presuntivas positivas y negativas

AGUA RESIDUAL. <i>E coli</i>					
MUESTRA	RECuento TOTAL	COLONIAS VERDADERAS POSITIVAS	COLONIAS VERDADERAS NEGATIVAS	COLONIAS FALSAS POSITIVAS	COLONIAS FALSAS NEGATIVAS
1	10	6	4	0	0
2	9	5	4	0	0
3	8	5	3	0	0
4	11	6	5	0	0
5	7	4	2	1	0
6	9	5	4	0	0
7	10	7	3	0	0
8	8	4	1	1	2
9	7	5	2	0	0
10	10	6	4	0	0
11	8	6	2	0	0
12	8	5	3	0	0
13	6	4	2	0	0
14	9	5	4	0	0
15	10	7	3	0	0

Tabla 18 Confirmación bioquímica de colonias presuntivas positivas y negativas

AGUA SUPERFICIAL. COLIFORMES TOTALES					
MUESTRA	RECuento TOTAL	COLONIAS VERDADERAS POSITIVAS	COLONIAS VERDADERAS NEGATIVAS	COLONIAS FALSAS POSITIVAS	COLONIAS FALSAS NEGATIVAS
1	14	7	4	3	0
2	12	9	3	0	0
3	14	9	5	0	0
4	11	9	2	0	0
5	12	8	4	0	0
6	13	9	4	0	0
7	13	9	4	0	0
8	12	9	3	0	0
9	15	10	5	0	0
10	12	8	3	1	0
11	12	8	4	0	0
12	15	9	5	0	1
13	11	9	2	0	0
14	13	8	5	0	0
15	16	10	6	0	0

Tabla 19 Confirmación bioquímica de colonias presuntivas positivas y negativas

AGUA SUPERFICIAL. <i>E. coli</i>					
MUESTRA	RECuento TOTAL	COLONIAS VERDADERAS POSITIVAS	COLONIAS VERDADERAS NEGATIVAS	COLONIAS FALSAS POSITIVAS	COLONIAS FALSAS NEGATIVAS
1	9	5	3	0	1
2	7	5	2	0	0
3	6	4	2	0	0
4	7	2	2	2	1
5	9	5	4	0	0
6	6	4	2	0	0
7	8	5	3	0	0
8	9	5	4	0	0
9	6	4	2	0	0
10	5	3	2	0	0
11	9	5	2	0	2
12	7	4	3	0	0
13	7	5	2	0	0
14	11	7	4	0	0
15	7	5	2	0	0

En las tablas 14, 15, 16, 17, 18 y 19 se presentan los resultados del recuento del 10% de colonias de una muestra analizada por cada tipo de matriz y el resultado de la confirmación bioquímica de las colonias presuntivas positivas y las presuntivas negativas, con el fin de poder establecer características de rendimiento analizadas más adelante.

6.5. Límites de detección y cuantificación

Tabla 20 Límite de detección y cuantificación de Coliformes totales

PROMEDIO	5,1
DS	1,197219
Límite crítico	2
Límite de detección	4
Límite de cuantificación	12

Tabla 21 Límite de detección y cuantificación de *E. coli*

PROMEDIO	2,1
DS	1,10050493
Límite crítico	1,8
Límite de detección	4
Límite de cuantificación	11

Se preparó un inóculo con una concentración cercana a 3UFC/100 mL, tanto de *E. coli* como de Coliformes totales teniendo en cuenta que este es límite de detección teórico según los modelos estadísticos de Poisson y Binomial negativo. Se procesó esta concentración 10 veces y se halló el límite de detección para Coliformes totales y de *E. coli* en 4 UFC/100 mL, el cual se acerca al límite teórico de los modelos, lo que significa que es la menor cantidad de microorganismos que debe contener una muestra para que pueda ser detectada de manera confiable a un nivel de significancia del 95%, así mismo se estableció un límite de cuantificación de 11 UFC/100 mL para *E. coli* (tabla 21) y 12 para Coliformes totales (tabla 20) significando este es el número mínimo confiable para reportar.

6.6. Análisis de varianzas

En el anexo 2 se observa el resultado del análisis de varianza de un factor, aplicada a los grupos de datos obtenidos para las muestras de agua residual adicionada con estándar alto y estándar medio de *E. coli* (tabla 7) y Coliformes totales (tabla 8), de agua superficial adicionada con estándar alto y estándar medio de *E. coli* (tabla 9) y Coliformes totales (tabla 10), de agua subterránea adicionada con estándar alto y estándar medio de *E. coli* (tabla 11) y Coliformes totales

(tabla 12) analizadas por 2 analistas diferentes, se observa que el valor F calculado en cada caso es menor que el respectivo valor F crítico establecido en el análisis de varianza, lo que significa que no existen diferencias significativas debidas al cambio de analista. En términos generales se puede concluir que en general los valores medidos por cada analista son semejantes entre sí en cada una de las muestras y que los analistas no ejercen sesgo sobre el método de análisis.

6.7. Repetibilidad

Tabla 22 Repetibilidad para el estándar medio Coliformes totales en agua subterránea UFC/100mL

MEDIA ARITMÉTICA	3,262091616	3,268079984
VARIANZA	0,001	0,003
Valores para X^2_{r-1}	0,005	0,011
Varianza operacional relativa	0,306	0,306
REPETIBILIDAD	55%	55%

Tabla 23 Repetibilidad para el estándar alto Coliformes totales en agua subterránea UFC/100mL

MEDIA ARITMÉTICA	3,410713385	3,404998798
VARIANZA	0,012	0,006
Valores para X^2_{r-1}	0,050	0,025
Varianza operacional relativa	0,292	0,293
REPETIBILIDAD	54%	54%

Tabla 24 Repetibilidad para el estándar medio *E. coli* en agua subterránea UFC/100mL

MEDIA ARITMÉTICA	1,691293569	1,797119918
VARIANZA	0,048	0,022
Valores para X^2_{r-1}	0,401	0,171
Varianza operacional relativa	0,574	0,550
REPETIBILIDAD	76%	74%

Tabla 25 Repetibilidad para el estándar alto *E. coli* en agua subterránea UFC/100mL

MEDIA ARITMÉTICA	2,632468256	2,686590857
VARIANZA	0,008	0,004
Valores para X^2_{r-1}	0,043	0,020
Varianza operacional relative	0,379	0,372
REPETIBILIDAD	62%	61%

Tabla 26 Repetibilidad para el estándar medio Coliformes totales en agua residual UFC/100mL

MEDIA ARITMÉTICA	2,273457392	2,262131017
VARIANZA	0,014	0,008
Valores para X^2_{r-1}	0,085	0,049
Varianza operacional relativa	0,437	0,441
REPETIBILIDAD	66%	66%

Tabla 27 Repetibilidad para el estándar alto Coliformes totales en agua residual UFC/100mL

MEDIA ARITMÉTICA	2,91727149	2,943982422
VARIANZA	0,002	0,002
Valores para X^2_{r-1}	0,008	0,009
Varianza operacional relativa	0,343	0,339
REPETIBILIDAD	59%	58%

Tabla 28 Repetibilidad para el estándar medio *E. coli* en agua residual UFC/100mL

MEDIA ARITMÉTICA	1,869587023	1,918944536
VARIANZA	0,007	0,014
Valores para X^2_{r-1}	0,053	0,102
Varianza operacional relativa	0,533	0,517
REPETIBILIDAD	73%	72%

Tabla 29 Repetibilidad para el estándar alto *E. coli* en agua residual UFC/100mL

MEDIA ARITMÉTICA	2,732759811	2,726969905
VARIANZA	0,003	0,003
Valores para X^2_{r-1}	0,015	0,015
Varianza operacional relativa	0,366	0,366
REPETIBILIDAD	60%	61%

Tabla 30 Repetibilidad para el estándar medio Coliformes totales en agua superficial UFC/100mL

MEDIA ARITMÉTICA	2,543888851	2,5369713
VARIANZA	0,010	0,007
Valores para X^2_{r-1}	0,055	0,039
Varianza operacional relativa	0,392	0,393
REPETIBILIDAD	63%	63%

Tabla 31 Repetibilidad para el estándar alto Coliformes totales en agua superficial UFC/100mL

MEDIA ARITMÉTICA	2,986014416	2,969524202
VARIANZA	0,001	0,001
Valores para X^2_{r-1}	0,005	0,005
Varianza operacional relativa	0,335	0,337
REPETIBILIDAD	58%	58%

Tabla 32 Repetibilidad para el estándar medio *E. coli* en agua superficial UFC/100mL

MEDIA ARITMÉTICA	1,645646785	1,654105
VARIANZA	0,023	0,016
Valores para X^2_{r-1}	0,195	0,136
Varianza operacional relativa	0,599	0,599
REPETIBILIDAD	77%	77%

Tabla 33 Repetibilidad para el estándar alto *E. coli* en agua superficial UFC/100mL

MEDIA ARITMÉTICA	2,646367234	2,666429033
VARIANZA	0,002	0,005
Valores para X^2_{r-1}	0,008	0,024
Varianza operacional relativa	0,378	0,374
REPETIBILIDAD	61%	61%

Se trabaja con 10 réplicas de la misma muestra, analizada en condiciones de repetibilidad, tal como lo establece la norma ISO 13843:2017. El valor crítico para la distribución Chi cuadrado en una probabilidad de 0,05 para 15-1 grados de libertad es: 23,685. Por lo tanto, se observa que todos los valores X^2_{r-1} están por debajo de dicho valor crítico y los valores de repetibilidad obtenidos por cada analista son similares entre sí. Esto nos permite deducir que la variabilidad entre recuentos paralelos cumple con la distribución de Poisson, cuando se analizan separadamente los resultados de cada analista, teniendo en cuenta el estándar, el microorganismo y las matrices. (tablas 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 31, 32 y 33)

6.8. Precisión intermedia

Tabla 34 Precisión intermedia para el estándar medio Coliformes totales

MEDIA ARITMÉTICA	2,69110336
VARIANZA	0,431052528
Valores para X^2_{r-1}	6,144973585
Varianza operacional relativa	0,312073901
REPRODUCIBILIDAD	56%

Tabla 35 Precisión intermedia para el estándar alto Coliformes totales

MEDIA ARITMÉTICA	3,105417452
VARIANZA	0,224682798
Valores para X^2_{r-1}	1,446803879
Varianza operacional relativa	0,298719297
REPRODUCIBILIDAD	55%

Tabla 36 Precisión intermedia para el estándar medio *E. coli*

MEDIA ARITMÉTICA	1,762782805
VARIANZA	0,178623487
Valores para X^2_{r-1}	1,61089906
Varianza operacional relativa	0,50980166
REPRODUCIBILIDAD	71%

Tabla 37 Precisión intermedia para el estándar alto *E. coli*

MEDIA ARITMÉTICA	2,681930849
VARIANZA	0,072232948
Valores para X^2_{r-1}	0,173146256
Varianza operacional relativa	0,36282323
REPRODUCIBILIDAD	60%

Se trabajó con 30 réplicas de la misma muestra, analizada en condiciones de reproducibilidad, donde la norma ISO 13843:2017 establece que se trabaje como mínimo con 30 datos. Se realizó un análisis de precisión intermedia variando, microorganismo, concentración del estándar y analista. El método tiene un rendimiento del método entre el 55% (tabla 334) y el 56%, (Tabla 35) para los Coliformes totales, y de 71% (tabla 36) y 60% (tabla 37) para *Escherichia coli*.

La norma ISO 13843:2017 e ISO 29201:2012 no establece valores de referencia de aceptabilidad de los porcentajes de precisión intermedia, ya que está dada en términos de incertidumbre estándar relativa y se expresa en porcentaje porque la relación matemática de las principales fuentes de influencia (dilución, conteo y volumen) es un producto.

6.9. Recuperación en matriz

Tabla 38 Agua subterránea estándar medio Coliformes totales

% DE RECUPERACION
82

Tabla 39 Agua subterránea estándar alto Coliformes totales

% DE RECUPERACION
78%

Tabla 40 Agua subterránea estándar medio *E. coli*

% DE RECUPERACION
70%

Tabla 41 Agua subterránea estándar alto *E. coli*

% DE RECUPERACION
78%

Tabla 42 Agua residual estándar medio Coliformes totales

% DE RECUPERACION
70%

Tabla 43 Agua residual estándar alto Coliformes totales

% DE RECUPERACION
80%

Tabla 44 Agua residual estándar medio *E. coli*

% DE RECUPERACION
76%

Tabla 45 Agua residual estándar alto *E. coli*

% DE RECUPERACION
80%

Tabla 46 Agua superficial estándar medio Coliformes totales

% DE RECUPERACION
70%

Tabla 47 Agua superficial estándar alto Coliformes totales

% DE RECUPERACION
70%

Tabla 48 Agua superficial estándar medio *E. coli*

% DE RECUPERACION
112%

Tabla 49 Agua superficial estándar alto *E. coli*

% DE RECUPERACION
111%

Gracias al porcentaje de recuperación se puede establecer la exactitud del método, esto se realiza mediante el número de microorganismos que se cuentan en la caja comparándolos con los adicionados inicialmente. El laboratorio define que los porcentajes de recuperación aceptados internamente son del 70% al 130%, por lo tanto, todos los ensayos cumplen con este criterio (tablas 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 y 49). Esto demuestra que el método no presenta sesgo significativo debido a interferencias presentes en la matriz de las muestras ni al proceso de análisis mismo. Así mismo indica que el medio colisntant presenta condiciones adecuadas para ser utilizado en este método puesto que los porcentajes de recuperación de los microorganismos en el mismo están dentro de los establecidos

6.10. Criterio de precisión

Tabla 50 Criterio de precisión de *E. coli* en agua subterránea

CRITERIO DE PRECISIÓN	0,42503385
-----------------------	------------

Tabla 51 Criterio de precisión de *E. coli* en agua residual

CRITERIO DE PRECISIÓN	0,27148836
-----------------------	------------

Tabla 52 Criterio de precisión de *E. coli* en agua superficial

CRITERIO DE PRECISIÓN	0,30492261
-----------------------	------------

53 Criterio de precisión de Coliformes totales en agua subterránea

CRITERIO DE PRECISIÓN	0,24430047
-----------------------	------------

Tabla 54 Criterio de precisión de Coliformes totales en agua residual

CRITERIO DE PRECISIÓN	0,28928765
-----------------------	------------

Tabla 55 Criterio de precisión de Coliformes totales en agua superficial

CRITERIO DE PRECISIÓN	0,18286248
-----------------------	------------

En las tablas 50, 51, 52, 53, 54, y 55 se presentan los criterios de precisión con los que a partir de la validación se empezaran a trabajar en el laboratorio.

6.11. Rendimiento

Tabla 56 Características de rendimiento para Coliformes totales en agua superficial

Sensibilidad	98%	>90%	Cumple
Especificidad	95%	>80%	Cumple
Tasa falsos positivos	2%		
Tasa falsos negativos	3%		
Selectividad	68%	>10%	Cumple
Eficiencia	97%		

Tabla 57 Características de rendimiento para *E. coli* en agua superficial

Sensibilidad	99%	>90%	Cumple
Especificidad	93%	>80%	Cumple
Tasa falsos positivos	3%		
Tasa falsos negativos	2%		
Selectividad	68%	>10%	Cumple
Eficiencia	96%		

Tabla 58 Características de rendimiento para Coliformes totales en agua residual

Sensibilidad	97%	>90%	Cumple
Especificidad	96%	>80%	Cumple
Tasa falsos positivos	2%		
Tasa falsos negativos	6%		
Selectividad	69%	>10%	Cumple
Eficiencia	97%		

Tabla 59 Características de rendimiento para *E. coli* en agua residual

Sensibilidad	98%	>90%	Cumple
Especificidad	96%	>80%	Cumple
Tasa falsos positivos	2%		
Tasa falsos negativos	4%		
Selectividad	62%	>10%	Cumple
Eficiencia	97%		

Tabla 60 Características de rendimiento para Coliformes totales en agua subterránea

Sensibilidad	98%	>90%	Cumple
Especificidad	95%	>80%	Cumple
Tasa falsos positivos	2%		
Tasa falsos negativos	3%		
Selectividad	68%	>10%	Cumple
Eficiencia	97%		

Tabla 61 Características de rendimiento para *E coli* en agua subterránea

Sensibilidad	91%	>90%	cumple
Especificidad	87%		
Tasa de falsos positivos	3%		
Tasa de falsos negativos	7%		
Selectividad	60%	>10%	cumple
Eficiencia	95%		

En las tablas 56, 57, 58, 59, 60 y 61 se observa que cada uno de los parámetros de rendimiento calculados para cada matriz cumplen con los criterios de aceptabilidad establecida por la norma ISO 13843:2017. Lo que indica que mediante la utilización del agar Colisntant el método presenta un óptimo rendimiento de arrojar los resultados confiables

En el anexo 3 se encuentran los diagramas de frecuencias de cada una de las muestras

7. Conclusiones

Se estableció la estandarización de las concentraciones de los microorganismos analizados en ciertas diluciones, teniendo en cuenta el comportamiento de crecimiento de los mismos, utilizando las diluciones 10^{-6} y 10^{-7} para definir los estándares medios y bajos respectivamente.

Al realizar el análisis estadístico a cada una de las matrices de agua no se observó diferencias significativas estadísticas entre los entre los resultados obtenidos por cada analista para cada uno de los ensayos, ya que en cada caso el valor p fue mayor a 0,05

Al determinar características de rendimiento y porcentaje de recuperación en el agar Colinstat usando el método de filtración por membrana para la detección y recuento simultaneo de Coliformes totales y *Escherichia coli* se estableció que se mantienen los parámetros de repetibilidad, reproducibilidad, sensibilidad, selectividad, eficiencia, incertidumbre, recuperación en matriz, precisión intermedia dentro de los criterios establecidos por el laboratorio, demostrándose que el método bajo las condiciones del laboratorio es confiable, repetible y reproducible.

8. Bibliografía

AWWA- WPCF, 2017. Standard methods for the examination of water and wastewater, 23rd edition.

GUIA TECNICA COLOMBIANA, 84, 2003. Calidad del agua. Guía para la orientación acerca de la validación de métodos de análisis microbiológico, ICONTEC. Bogotá.

NORMA TECNICA COLOMBIANA, NTC-ISO, 17025, 2005. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración, INCOTEC, Bogotá.

NORMA TECNICA COLOMBIANA, NTC 4772, 2008. Calidad del agua. Detección y recuento de *Escherichia coli* y bacterias Coliformes, parte 1: método de filtración por membrana, ICONTEC, Bogotá.

HACH COMPANY, 2000. Manual de análisis de agua. Segunda edición, Loveland, Colorado, EE.UU.

Ordoñez M; Rojas D, 2007. Diseño y elaboración de una guía preliminar para la validación de métodos microbiológicos estándar. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá.

Matallana A. 2015. Validación de técnicas analíticas. Análisis farmacéutico INVIMA

Dumaff B; Rojas f; Guerrero I, Roa L, Rodríguez L; Soto M; Aguilera M, 2010. Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición. Aspectos generales sobre la validación de métodos. Instituto de Salud Pública. Santiago de Chile

Ospino G. 2013. Filtración por membrana para la detección de Coliformes totales y *Escherichia coli* en aguas. Universidad de Pamplona. Pamplona.

Palma R; Otiz J; Garnica E; López L; Peñaranda S; Raad J. 1999. Análisis de agua para el consumo humano. Instituto Nacional de Salud Pública, Bogotá.

Scharlau Microbiology, 2012. - Ficha de Datos Técnicos. Versión: 04-2012. Disponible en: <http://www.annardx.com/productos/images/productos/industria/microbiologia-industrial/01618500.pdf>

Urrego Laiton, J. Confirmación de métodos microbiológicos, cuantitativos, cualitativos y estimación de la incertidumbre, 2018.

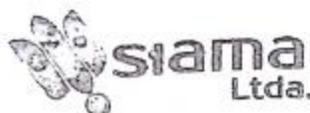
Camaró, M; Martínez, R; Olmos, P; Catalá, V; Ocete, D; Cardona, C. Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos. Enfermedades infecciosas, microbiología clínica Vol. 33. Núm. 7. 2015.

International Organization for Standardization. ISO13843, 2017. Water quality. Requirements for establishing performance characteristics of quantitative microbiological methods

International Organization for Standardization. ISO 29201, 2012. Water quality. The variability of test results and the uncertainty of measurement of microbiological enumeration methods

9. Anexos

Anexo 1. Método ecométrico



**SERVICIOS INTEGRADOS PARA LA INDUSTRIA DEL AGRO,
MINERO-ENERGETICA Y EL MEDIO AMBIENTE**

VALORES DE PRODUCTIVIDAD Y SELECTIVIDAD. MÉTODO ECOMÉTRICO

CÓDIGO	R- 003	VERSIÓN	0.0	FECHA	18/09/10
---------------	---------------	----------------	------------	--------------	-----------------

Fecha: _____

MEDIO SOLIDO:

Instrucciones: En cada uno de los espacios destinados para cada línea de cada cuadrante, marque una + si hay crecimiento o un - si no lo hay. Sume el número de positivos para cada cuadrante y luego multiplíquelo por 0,2. En la línea 5 se coloca 1 si hay crecimiento. Sume los resultados para obtener el ICA.

**Valoración: Productividad**

Microorganismo control: _____

Cuadrante	Estría					Suma
	1	2	3	4	5	
1						
2						
3						
4						
Línea 5						

ICA (Criterio para productividad $>2,5$)= _____

ICR: ICA en el medio selectivo / ICA en el medio no selectivo

Valoración: selectividad

Microorganismo control: _____

Cuadrante	Estría					Suma
	1	2	3	4	5	
1						
2						
3						
4						
Línea 5						

ICA (Criterio para selectividad $<2,0$)= _____

ICR = _____

Responsable: _____

Fecha de lectura: _____

Anexo 2. Análisis de varianzas**Matriz subterránea estándar medio Coliformes totales**

<i>Groups</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
ANALISTA 1	15	48,93137424	3,262091616	0,00123292
ANALISTA 2	15	49,02119976	3,268079984	0,002546841

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0,000268954	1	0,000268954	0,142312786	0,708836789	4,195971819
Dentro de los grupos	0,052916651	28	0,00188988			
Total	0,053185605	29				

Matriz subterránea estándar alto Coliformes totales

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
ANALISTA 1	15	51,1607008	3,41071338	0,012238654
ANALISTA 2	15	51,074982	3,4049988	0,006067321

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0,00024492	1	0,00024492	0,026758891	0,87123568	4,19597182
Dentro de los grupos	0,25628365	28	0,00915299			
Total	0,25652857	29				

Matriz subterránea estándar medio. *E. coli*

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
ANALISTA 1	15	25,36940354	1,69129357	0,048460752
ANALISTA 2	15	26,95679877	1,79711992	0,02189532

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0,08399412	1	0,08399412	2,387686479	0,133523165	4,195971819
Dentro de los grupos	0,984985003	28	0,03517804			
Total	1,068979123	29				

Matriz subterránea estándar alto. *E. coli*

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
ANALISTA 1	15	39,48702383	2,632468256	0,00806193
ANALISTA 2	15	40,29886285	2,686590857	0,00384446

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0,02196942	1	0,02196942	3,69035833	0,064962895	4,195971819
Dentro de los grupos	0,166689438	28	0,005953194			
Total	0,188658858	29				

Matriz residual estándar medio Coliformes totales

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>		
ANALISTA1	15	34,101861	2,27345739	0,013735265		
ANALISTA2	15	33,931965	2,26213102	0,007907418		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0,000962151	1	0,00096215	0,088912352	0,767766002	4,195971819
Dentro de los grupos	0,302997559	28	0,01082134			
Total	0,30395971	29				

Matriz residual estándar alto Coliformes totales

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>		
ANALISTA1	15	43,75907235	2,91727149	0,001667075		
ANALISTA2	15	44,15973632	2,943982422	0,00198449		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0,005351054	1	0,005351054	2,930827833	0,097959262	4,19597182
Dentro de los grupos	0,051121909	28	0,001825782			
Total	0,056472963	29				

Matriz residual estándar medio *E. coli*

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>			
ANALISTA 1	15	28,04380	1,8695870	0,00707055			
		535	2	7			
ANALISTA 2	15	28,78416	1,9189445	0,01400775			
		804	4	4			
ANÁLISIS DE VARIANZA							
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>	
Entre grupos	0,01827123	1	0,0182712	1,73365225	0,19862108	4,19597181	
			3	8	5	9	
Dentro de los grupos	0,295096349	28	0,0105391				
			6				
Total	0,313367579	29					

Matriz residual estándar alto *E. coli*

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>			
ANALISTA 1	15	40,99139716	2,73275981	0,002990085			
ANALISTA 2	15	40,90454857	2,7269699	0,002989093			
ANÁLISIS DE VARIANZA							
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>	
Entre grupos	0,000251423	1	0,00025142	0,084099391	0,773953884	4,19597182	
Dentro de los grupos	0,083708481	28	0,00298959				
Total	0,083959903	29					

Matriz superficial estándar medio Coliformes totales

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
ANALISTA1	15	38,15833277	2,54388885	0,009988646
ANALISTA2	15	38,0545695	2,5369713	0,007067584

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0,000358894	1	0,00035889	0,042083613	0,83894455	4,195971819
Dentro de los grupos	0,238787223	28	0,00852812			
Total	0,239146117	29				

Matriz superficial estándar alto Coliformes totales

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
ANALISTA1	15	44,7902162	2,98601442	0,000965511
ANALISTA2	15	44,542863	2,9695242	0,00106607

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0,002039454	1	0,00203945	2,007750413	0,167528445	4,195971819
Dentro de los grupos	0,028442133	28	0,00101579			
Total	0,030481587	29				

Matriz superficial estándar medio *E. coli*

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
ANALISTA 1	15	24,6847018	1,645646785	0,022928124
ANALISTA 2	15	24,811575	1,654105	0,016025982

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0,000536561	1	0,000536561	0,027548346	0,869367776	4,195971819
Dentro de los grupos	0,545357492	28	0,019477053			
Total	0,545894053	29				

Matriz superficial estándar alto *E. coli*

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
ANALISTA 1	15	39,6955085	2,646367234	0,001567414
ANALISTA 2	15	39,9964355	2,666429033	0,004517354

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0,003018568	1	0,003018568	0,992171911	0,327742861	4,195971819
Dentro de los grupos	0,085186757	28	0,003042384			
Total	0,088205325	29				

Anexo 3. Diagramas de frecuencias para establecer características de rendimiento

Diagrama de Frecuencias para Coliformes totales en agua superficial

		Recuento Presuntivo		
		P	N	
Recuento Confirmativo	P	129	2	131
	N	3	56	59
		132	58	190

Diagrama de frecuencias para *E. coli* en agua superficial

		Recuento Presuntivo		
		p	n	
Recuento Confirmativo	p	131	1	132
	n	4	56	60
		135	59	194

Diagrama de frecuencias para Coliformes totales en agua residual

		Recuento Presuntivo		
		p	n	
Recuento confirmativo	p	114	3	117
	n	2	46	48
		116	49	165

Diagrama de frecuencias para *E. coli* en agua residual

		Recuento Presuntivo		
		p	n	
Recuento confirmativo	p	80	2	82
	n	2	46	48
		82	48	130

Diagrama de frecuencias para Coliformes totales en agua subterránea

		Recuento presuntivo		
		p	n	
Recuento confirmativo	p	129	2	131
	n	3	56	59
		132	58	190

Diagrama de frecuencias para para *E. coli* en agua subterránea

		Recuento presuntivo		
		p	n	
Recuento Confirmativo	p	72	3	75
	n	3	42	45
		75	45	120

Anexo 4. FUENTES QUE INTERFIEREN EN EL ENSAYO

A continuación se identifican las posibles fuentes que podrían afectar el resultado de los ensayos, sino se controlan:

Técnicas y/o instrumentos, asociadas a:

- Al material de referencia
- A la uniformidad de la distribución de los microorganismos en la muestra
- A la exactitud de los equipos utilizados para las mediciones de masa y/o volumen
- Al volumen de muestra empleado
- A la calidad del medio de cultivo
- A las condiciones de incubación
- A las fluctuaciones de temperatura de la incubadora
- Taza de crecimiento del microorganismo en estudio

Humanas, asociadas a:

- Toma de la muestra
- A la lectura e interpretación de resultados
- A la homogenización de la muestra
- La manipulación de las muestras por parte de los analistas
- Agitación de la muestra para la toma de sub muestras
- A la experiencia del personal
- A la reproducibilidad de las mediciones por cambios de analistas y/o instrumentos

Ambientales, asociadas a:

- Ciclos circadianos
 - Condiciones de temperatura, humedad y polvo
 - Contaminación cruzada
-