UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA

TITULACIÓN DE INGENIERO QUÍMICO

Validación de los métodos microbiológicos de filtración por membrana para la determinación de: coliformes fecales, coliformes totales, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa* en la matriz de agua potable, natural y residual en los Laboratorios UTPL.

TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

AUTORA: Vivanco Abarca, Daisy María

DIRECTOR: Guamán Caraguay, José Miguel, Ing.

LOJA - ECUADOR
2014

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

Ingeniero.
José Miguel Guamán Caraguay.
DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de fin de titulación: "Validación de los métodos microbiológicos de filtración por membrana para la determinación de: coliformes fecales, coliformes totales, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa* en la matriz de agua potable, natural y residual en los Laboratorios UTPL" realizado por: Vivanco Abarca Daisy María, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, febrero de 2014.

f)…….
Guamán Caraguay José Miguel
CI: 1102160627

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

¨Yo, Vivanco Abarca Daisy María, declaro ser autora del presente trabajo de fin de titulación: Validación de los métodos microbiológicos de filtración por membrana para la determinación de: coliformes fecales, coliformes totales, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa* en la matriz de agua potable, natural y residual en los Laboratorios UTPL, de la Titulación de Ingeniero Químico, siendo José Miguel Guamán Caraguay director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además Certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 67 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”.

f)……
Vivanco Abarca Daisy María
CI: 1104744550

AGRADECIMIENTO

Una de las alegrías que experimento al culminar mi carrera universitaria, es mirar el trayecto vivido y recordar a todos mis familiares, profesores y amigos; quienes me han ayudado y apoyado durante toda o en alguna etapa de este largo, pero gratificante camino.

Siempre estaré agradecida con Dios, por ser el mentor de mi existencia, por darme sabiduría y perseverancia en cada paso que doy y por sus infinitas bendiciones, que se manifiestan al haberme rodeado de personas tan magnificas a las cuales quiero expresar mi profundo reconocimiento:

Estoy muy agradecida con el Ingeniero José Miguel Guamán, por haberme dado la oportunidad de realizar este proyecto, por compartir conmigo su conocimiento y experiencia y por brindarme su amistad y confianza. Ha sido un honor trabajar bajo su dirección.

Mi más sincero agradecimiento al Ingeniero Silvio Aguilar e Ingeniera Nathaly Solano, por su tiempo, empatía, paciencia y comprensión. Estoy muy agradecida por sus comentarios alentadores y constructivos durante la revisión de la tesis, gracias por ayudar a moldear mi trabajo con claridad y sencillez.

Quiero extender mi gratitud a la Dra. Silvia Gonzalez, Ingeniero Celso Romero e Ingeniero Juan Carlos Romero, por su entusiasmo, inspiración y grandes esfuerzos. De igual manera me gustaría agradecer a todos los que forman parte de la Universidad y principalmente a quienes fueron mis docentes, juntos me han proporcionado buenas enseñanzas, consejos sanos y estímulos para nuevas ideas.

Un agradecimiento muy especial a la Dra. Paulina Cela e Ingeniera Diana Hualpa, por colaborarme con su vasta experiencia en el campo de la microbiología durante la elaboración de mi tesis.

A mis amigas y amigos, que siempre están alentándome a continuar y con los cuales se mantiene una buena amistad en las buenas y malas circunstancias.

Finalmente doy las gracias a mi familia, principalmente estoy eternamente agradecida con mi madre por haberme dado la vida, por su amor y sacrificios para educarme y prepararme para un mejor futuro.

DEDICATORIA

Con todo mi cariño dedico este trabajo a mi familia, en especial a:

Mis abuelos Filoteo y María de Jesús, mi hermano Jimmy y mi madre Fanny; con amor me enseñaron la importancia de la educación, respeto, honestidad y sencillez. Me enseñaron a valorar lo que tenemos y buscar siempre la superación a pesar de cualquier circunstancia.

Ustedes son el principal ejemplo en el que me guío y en el que me fortalezco. Me brindan su comprensión, paciencia, consejos y apoyo incondicional solo con el objetivo de verme feliz. Por esto y mucho más, este logro también es suyo.

Gracias por ser mi soporte, luz y alegría.

Daisy María Vivanco Abarca

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN ii
CESIÓN DE DERECHOS iii
AGRADECIMIENTO iv
DEDICATORIA v
INDICE DE CONTENIDOS vi
INDICE DE TABLAS viii
INDICE DE GRAFICAS xi
INDICE DE IMÁGENES xii
INDICE DE ABREVIATURAS xiii
RESUMEN 1
ABSTRACT 2

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1. Introducción 4
1.2. Justificación 5
1.3. Fin y propósito del proyecto 4
1.4. Objetivos 6
1.5. Antecedentes 7

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Calidad del agua 10
2.2. Análisis microbiológico del agua 10
2.3. Niveles de seguridad biológica 11
2.4. Microorganismos indicadores de la calidad del agua 12
2.5. Filtración por membrana 16
2.6. Validación de métodos microbiológicos 18

CAPÍTULO III
METODOLOGÍA

3.1. Generalidades 20
3.2. Estándar nefelométrico de Mcfarland 21
3.3. Preparación de inóculos bacterianos 22
3.4. Diseño de validación 23
3.5. Procedimientos 23

- **Determinación de coliformes fecales** 24
- **Determinación de coliformes totales** 30
- **Determinación de *Escherichia coli*** 36
- **Determinación de *Pseudomona aeruginosa*** 42

CAPÍTULO IV
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Determinación de los niveles de trabajo 49
4.2. Resultados de los ensayos de filtración por membrana 52
4.3. Linealidad 60
4.4. Límite de detección y límite de cuantificación 70
4.5. Recuperación 74
4.6. Repetibilidad 79
4.7. Reproducibilidad 82
4.8. Rango de trabajo 84
4.9. Incertidumbre 86

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones 90
5.2. Recomendaciones 91

BIBLIOGRAFÍA 92
ANEXOS 94

INDICE DE TABLAS

TABLA 1 Parámetros microbiológicos para agua potable 11
TABLA 2 Parámetros microbiológicos para agua natural 11
TABLA 3 Parámetros microbiológicos para agua residual 11
TABLA 4 Concentraciones para estandarización del tubo 0.5 de la escala de Mcfarland.... 22
TABLA 5 Resultados de suspensiones de trabajo para la cepa de *E. coli*..... 49
TABLA 6 Resultados de suspensiones de trabajo para la cepa de *P. aeruginosa*..... 49
TABLA 7 Resultados de ensayos en las matrices de trabajo seleccionadas 50
TABLA 8 Niveles de trabajo para coliformes fecales 50
TABLA 9 Niveles de trabajo para coliformes totales 51
TABLA 10 Niveles de trabajo para *Escherichia coli*..... *51*
TABLA 11 Niveles de trabajo para *Pseudomona aeruginosa* 51
TABLA 12 Resultados de coliformes fecales en muestras de agua potable 52
TABLA 13 Resultados de coliformes fecales en muestras de agua natural 53
TABLA 14 Resultados de coliformes fecales en muestras de agua residual. 53
TABLA 15 Resultados de coliformes totales en muestras de agua potable 54
TABLA 16 Resultados de coliformes totales en muestras de agua natural 55
TABLA 17 Resultados de coliformes totales en muestras de agua residual**.** 55
TABLA 18 Resultados de *Escherichia coli* en muestras de agua potable 56
TABLA 19 Resultados de *Escherichia coli* en muestras de agua natural 57
TABLA 20 Resultados de *Escherichia coli* en muestras de agua residual 57
TABLA 21 Resultados de *Pseudomona aeruginosa* en muestras de agua potable 58
TABLA 22 Resultados de *Pseudomona aeruginosa* en muestras de agua natural..... 59
TABLA 23 Resultados de *Pseudomona aeruginosa* en muestras de agua residual 59
TABLA 24 Valores experimentales y objetivo de coliformes fecales para agua potable 60
TABLA 25 Coeficiente de correlación y pendiente para coliformes fecales en agua potable61
TABLA 26 Valores experimentales y objetivo de coliformes fecales para agua natural 61
TABLA 27 Coeficiente de correlación y pendiente para coliformes fecales en agua natural 61
TABLA 28 Valores experimentales y objetivo de coliformes fecales para agua residual 62
TABLA 29 Coeficiente de correlación y pendiente para coliformes fecales en agua residual 62
TABLA 30 Valores experimentales y valores objetivo de coliformes totales para agua potable..... 63
TABLA 31 Coeficiente de correlación y pendiente para coliformes totales en agua potable 63
TABLA 32 Valores experimentales y valores objetivo de coliformes totales para agua natural. 63
TABLA 33 Coeficiente de correlación y pendiente para coliformes totales en agua natural 64
TABLA 34 Valores experimentales y valores objetivo de coliformes totales para la matriz de agua residual. 64

TABLA 35 Coeficiente de correlación y pendiente para coliformes totales en agua residual65
TABLA 36 Valores experimentales y valores objetivo de *Escherichia coli* para la matriz de agua potable. 66
TABLA 37 Coeficiente de correlación y pendiente para *Escherichia coli* en agua potable... 66
TABLA 38 Valores experimentales y valores objetivo de *Escherichia coli* en la matriz de agua natural. 66
TABLA 39 Coeficiente de correlación y pendiente para *Escherichia coli* en agua natural ... 66
TABLA 40 Valores experimentales (Y) y valores objetivo (X) de *Escherichia coli* en la matriz de agua residual. 67
TABLA 41 Coeficiente de correlación y pendiente para *Escherichia coli* en agua residual.. 67
TABLA 42 Valores experimentales (Y) y valores objetivo (X) de *Pseudomona aeruginosa* en la matriz de agua potable. 68
TABLA 43 Coeficiente de correlación y pendiente para *Pseudomona aeruginosa* en agua potable. 68
TABLA 44 Valores experimentales (Y) y valores objetivo (X) de *Pseudomona aeruginosa* en la matriz de agua natural. 68
TABLA 45 Coeficiente de correlación y pendiente para *Pseudomona aeruginosa* en agua natural. 69
TABLA 46 Valores experimentales (Y) y valores objetivo (X) de *Pseudomona aeruginosa* en la matriz de agua residual 69
TABLA 47 Coeficiente de correlación y pendiente para *Pseudomona aeruginosa* en agua residual 70
TABLA 48 Límite de detección y cuantificación para coliformes fecales en la matriz de agua potable, natural y residual 71
TABLA 49 Límite de detección y cuantificación para coliformes totales en la matriz de agua potable, natural y residual. 72
TABLA 50 Límite de detección y cuantificación para *Escherichia coli* en la matriz de agua potable, natural y residual 72
TABLA 51 Límite de detección y cuantificación para *Pseudomona aeruginosa* en la matriz de agua potable, natural y residual 73
TABLA 52 Recuperación para Coliformes fecales en la matriz de agua potable 75
TABLA 53 Recuperación para Coliformes fecales en la matriz de agua potable 75
TABLA 54 Recuperación para Coliformes fecales en la matriz de agua residual. 75
TABLA 55 Recuperación para Coliformes totales en la matriz de agua potable 76
TABLA 56 Recuperación para Coliformes totales en la matriz de agua natural 76
TABLA 57 Recuperación para Coliformes totales en la matriz de agua residual 76
TABLA 58 Recuperación para *Escherichia coli* en la matriz de agua potable 77
TABLA 59 Recuperación para *Escherichia coli* en la matriz de agua natural 77
TABLA 60 Recuperación para *Escherichia coli* en la matriz de agua residual. 77
TABLA 61 Recuperación para *Pseudomona aeruginosa* en la matriz de agua potable 78

TABLA 62 Recuperación para *Pseudomona aeruginosa* en la matriz de agua natural..... 78
TABLA 63 Recuperación para *Pseudomona aeruginosa* en la matriz de agua residual 78
TABLA 64 Coeficiente de variación para coliformes fecales en agua potable, natural y residual 79
TABLA 65 Coeficiente de variación para coliformes totales en agua potable, natural y residual 80
TABLA 66 Coeficiente de variación *para Escherichia coli* en las matrices de agua potable, natural y residual 80
TABLA 67 Coeficiente de variación para *Pseudomona aeruginosa* en cada matriz. 81
TABLA 68 Reproducibilidad para coliformes fecales. 82
TABLA 69 Reproducibilidad para coliformes totales. 83
TABLA 70 Reproducibilidad para *Escherichia coli.* 83
TABLA 71 Reproducibilidad para *Pseudomona aeruginosa*. 84
TABLA 72 Rango de trabajo para coliformes fecales 84
TABLA 73 Rango de trabajo para coliformes totales 85
TABLA 74 Rango de trabajo para *Escherichia coli* *85*
TABLA 75 Rango de trabajo para *Pseudomona aeruginosa* *85*
TABLA 76 Incertidumbre para coliformes fecales en agua potable. 86
TABLA 77 Incertidumbre para coliformes fecales en agua natural 86
TABLA 78 Incertidumbre para coliformes fecales en agua residual..... 86
TABLA 79 Incertidumbre para coliformes totales en agua potable. 87
TABLA 80 Incertidumbre para coliformes totales en agua natural. 87
TABLA 81 Incertidumbre para coliformes totales en agua residual. 87
TABLA 82 Incertidumbre para *Escherichia coli* en agua potable 87
TABLA 83 Incertidumbre para *Escherichia coli* en agua natural. 87
TABLA 84 Incertidumbre para *Escherichia coli* en agua residual. 88
TABLA 85 Incertidumbre para *Pseudomona aeruginosa* en agua potable. 88
TABLA 86 Incertidumbre para *Pseudomona aeruginosa* en agua natural. 88
TABLA 87 Incertidumbre para *Pseudomona aeruginosa* en agua residual..... 88

INDICE DE GRAFICAS

GRÁFICA 1 Linealidad de coliformes fecales en la matriz de agua potable..... 60
GRÁFICA 2 Linealidad de coliformes fecales en la matriz de agua natural 61
GRÁFICA 3 Linealidad de coliformes fecales en la matriz de agua residual 62
GRÁFICA 4 Linealidad de coliformes totales en la matriz de agua potable 63
GRÁFICA 5 Linealidad de coliformes totales en la matriz de agua natural 64
GRÁFICA 6 Linealidad de coliformes totales en la matriz de agua residual..... 64
GRÁFICA 7 Linealidad de *Escherichia coli* en la matriz de agua potable 65
GRÁFICA 8 Linealidad de *Escherichia coli* en la matriz de agua natural 66
GRÁFICA 9 Linealidad de *Escherichia coli* en la matriz de agua residual 67
GRÁFICA 10 Linealidad de *Pseudomona aeruginosa* en la matriz de agua potable..... 68
GRÁFICA 11 Linealidad de *Pseudomona aeruginosa* en la matriz de agua natural. 69
GRÁFICA 12 Linealidad de *Pseudomona aeruginosa* en la matriz de agua residual..... 70

INDICE DE IMÁGENES

IMAGEN 1 Células de bacteria coliformes fecales 13
IMAGEN 2 Células de coliformes totales 13
IMAGEN 3 Células de *Escherichia coli* 14
IMAGEN 4 Células de *Pseudomona aeruginosa* 15
IMAGEN 5 Infección dérmica por contacto con *Pseudomona aeruginosa* 15
IMAGEN 6 Equipo de filtración (Manifold) 16
IMAGEN 7 Kits de filtración desechables (NEOGEN) 17
IMAGEN 8 Medios de cultivo líquidos 17
IMAGEN 9 Proceso de activación de cepas bacterianas 21
IMAGEN 10 Preparación de suspensiones bacterianas 22
IMAGEN 11 Preparación y almacenamiento de niveles de trabajo 23
IMAGEN 12 Crecimiento de colonias típicas de coliformes fecales 28
IMAGEN 13 Crecimiento de colonias típicas de coliformes totales 34
IMAGEN 14 Crecimiento de colonias típicas de *Escherichia coli*. 40
IMAGEN 15 Crecimiento de colonias de *Pseudomona aeruginosa* 46
IMAGEN 16 Verificación de colonias de *Pseudomona aeruginosa* por fluorecencia a la luz UV y con cintas de oxidasa. 47
IMAGEN 17 Adición de la muestra de agua al portafiltros 95
IMAGEN 18 Adición del medio selectivo. 95
IMAGEN 19 Separación de la caja petri del embudo 95
IMAGEN 20 Incubación de las muestras en forma apilada. 95

INDICE DE ABREVIATURAS

ATCC American Type Culture Collection

C.M.C Valor objetivo para cada parámetro

CV Coeficiente de variación

HR Humedad relativa

IEC Comisión Internacional Electrotécnica

INEN Instituto Ecuatoriano de Normalización

ISO Organización Internacional de Estandarización

LDC Límite de cuantificación

LDD Límite de detección

ml Mililitro

NTE Norma Técnica Ecuatoriana

OAE Organismo de Acreditación Ecuatoriano

ºC Grado Celsius

p Nivel de confianza

S Desviación estándar

SR Desviación estándar relativo porcentual

TULAS Texto Unificado de legislación secundario

U Incertidumbre

UFC Unidad formadora de colonias

um Micrómetro

UTPL Universidad Técnica Particular de Loja

UV Ultravioleta

RESUMEN

El principal objetivo de este proyecto fue validar los métodos de filtración por membrana para la determinación de coliformes fecales, coliformes totales, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa* en las matrices de agua potable, natural y residual. Los métodos que se utilizaron, son métodos estandarizados que están descritos en el Standar Methods (2012).

Se realizó la validación de los métodos durante tres días en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad. La validación se la realizó en las propias matrices de agua potable, natural y residual, a las cuales se les añadió una cantidad conocida de microorganismos y se efectuó los ensayos de filtración por membrana.

Para determinar la validez del método, se calculó la linealidad, límites de cuantificación, rango de trabajo, precisión, recuperación e incertidumbre; obteniendo resultados que cumplen con los criterios de aceptación propuestos y con lo cual se confirmó que los métodos están validados.

El proceso de validación, se realizó con el fin de cumplir con los requisitos técnicos descritos en la Norma Técnica ISO/IEC: 17025 para laboratorios de ensayo.

PALABRAS CLAVES: Validación, coliformes fecales, coliformes totales, *Escherichia coli, Pseudomona aeruginosa*, agua potable, agua natural, agua residual, filtración de membrana.

ABSTRACT

The main objective of this project was to validate the membrane filter technique for the determination of fecal coliforms, total coliforms, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* in drinking, natural and waste water matrix. The methods used, are described in the Standar Methods (2012).

The method validation was performed for three days, under repeatability and reproducibility conditions. The validation was made in matrix of drinking, natural and waste water, to which was added a known amount of microorganisms and membrane filtration tests were conducted.

To determine the validity of the method, linearity, limit of quantitation, working range, precision, recovery and uncertainty was calculated. Obtaining results that meet the criteria of acceptance given and with these antecedents confirmed that the methods are validated.

The validation process was performed in order to fulfill the technical requirements described in ISO / IEC International Standard 17025 for testing laboratories.

KEYWORDS: Validation, fecal coliforms, total coliforms, *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa*, drinking water, natural water, wastewater.

CAPÍTULO I
INTRODUCCIÓN

1.1. Introducción

El agua es uno de los principales recursos de nuestro planeta, dado que su uso es extenso y esencial para la vida; por ello el agua debe cumplir con estándares de calidad para su uso y consumo, de tal manera que todas las personas dispongan de un suministro satisfactorio. Los ensayos que se realizan para controlar la calidad del agua son fisicoquímicos, de metales pesados, elementos traza (organofosforados, organoclorados) y microbiológicos. Estos parámetros son emitidos y controlados por las entidades de regulación y control ambiental del país.

El agua puede ser uno de los principales transmisores de enfermedades entéricas[1] y de infecciones cutáneas[2] si se llega a consumir en estado contaminado; uno de los principales microorganismos indicadores de contaminación fecal son los del grupo coliforme, los cuales generalmente se encuentran en la capa superficial o en el fondo del agua; esta es una de las razones principales por la cual los laboratorios que realizan ensayos microbiológicos de aguas deben validar las técnicas que desarrollan, de tal manera que se asegure la veracidad en sus resultados.

El presente trabajo de investigación busca validar la técnica de filtración por membrana para los parámetros de coliformes fecales, coliformes totales, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*, en la matriz de agua natural, potable y residual para la Sección Departamental de Ingeniería Ambiental de los Laboratorios UTPL.

La técnica de filtración por membrana es aceptada y utilizada a nivel nacional e internacional por entes reguladores debido a su fácil manejo, empleo y resultados directos[1]. Los métodos que se van a validar, son métodos normalizados descritos en el *Standar Methods*[3], pero ajustados a las condiciones de nuestro laboratorio.

La importancia de la validación radica en asegurar la calidad y confiablidad de los ensayos realizados, contribuyendo a las buenas prácticas para los laboratorios[4]; además es un requisito previo para realizar el proceso de acreditación.

La norma NTE-INEN ISO/IEC 17025:2006“Requisitos *generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración*” cap. V: de la validación de métodos analíticos, indica que “El laboratorio debe validar los métodos no normalizados, los métodos que diseñe

o desarrolla, los métodos normalizados empleados fuera del alcance previsto, así como las aplicaciones y modificaciones de los métodos que sean aptos para el fin previsto.
La validación debe ser tan amplia como sea necesario para satisfacer las necesidades del tipo de aplicación o del campo de aplicación dados. El laboratorio debe registrar los resultados obtenidos, el procedimiento utilizado para la validación y una declaración sobre la aptitud del método para el uso previsto”[5].

En nuestro país el Organismo de Acreditación Ecuatoriano (OAE) confirma o reconoce la competencia de los laboratorios utilizando como criterios de acreditación, los requisitos de la Norma ISO/IEC 17025.

Para lograr la validación, en el área de microbiología se dispone de la infraestructura necesaria para realizar los ensayos en aguas y su respectiva confirmación y se toma como referente la norma mencionada anteriormente.

1.2. Justificación

En todos los laboratorios, la validación de métodos de ensayo es un requisito primordial si se desea obtener resultados confiables[4]. La validación es la confirmación mediante el suministro de evidencia objetiva, de que se han cumplido los requisitos para una utilización o aplicación específica prevista[6].

En la actualidad, la calidad del agua es un tema de vital importancia y de absoluto control por parte de las entidades competentes; este control se basa en los criterios establecidos en las normas vigentes de la calidad del agua para todos sus usos y descargas.

Un aspecto fundamental, es la evaluación de los requisitos necesarios asociados con la calidad microbiológica del agua, ya que la presencia de ciertos microorganismos como coliformes fecales, totales, *E. coli y Pseudomona aeruginosa*, es la causa más frecuente de diversas enfermedades infecciosas, alteración de la producción agrícola y contaminación en el ambiente; la importancia de conocer estos microrganismos presentes en el agua es la de desarrollar nuevas tecnologías que logren su eliminación y de esta manera controlar las enfermedades que producen.

Por tal razón los Laboratorios UTPL que realizan ensayos microbiológicos deben validar sus métodos, para cumplir con estándares de calidad, reportar resultados confiables (de tal

manera que estos puedan tener aplicabilidad en las diferentes actividades)[8] y para incluir estos parámetros en el alcance de acreditación del laboratorio.

Se puede realizar ensayos microbiológicos usando métodos cuantitativos, fundamentados en la capacidad natural de los microorganismos de desarrollarse en un determinado medio de cultivo y con el fin de poder detectarlos y/o cuantificarlos[2]. La mayoría de las muestras de agua en su diferente matriz pueden ser analizadas por el método de filtración de membrana, actualmente este método normalizado es el más usado para evaluar la calidad sanitaria del agua.

Una de las principales ventajas de este método es que nos permite evaluar volúmenes muy variables de agua y nos ofrece un resultado directo de la concentración de bacterias, al mismo tiempo esta técnica facilita el procedimiento de ensayo, cuando se trabaja con numerosas muestras[3].

1.3. Fin y propósito del proyecto

❖ Fin del proyecto.

Validación los métodos microbiológicos de filtración por membrana para la determinación de: coliformes fecales, coliformes totales, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa* en la matriz de agua potable, natural y residual en los Laboratorios UTPL.

❖ Propósito del proyecto.

Contribuir a la confiabilidad de los resultados de los Laboratorios UTPL, en los ensayos microbiológicos de coliformes fecales, coliformes totales*, Escherichia coli* y P*seudomona aeruginosa* en la matriz de agua potable, natural y residual.

1.4. Objetivos

✓ Objetivo general.

Validar los métodos microbiológicos de filtración por membrana para la determinación de los parámetros de coliformes fecales, coliformes totales, *Escherichia coli* y *Pseudomona*

aeruginosa en la matriz de agua natural, potable y residual, con el propósito de garantizar la confiabilidad de los resultados obtenidos.

✓ **Objetivos específicos.**

-Establecer los parámetros de validación del método: Linealidad, límite de cuantificación, precisión, exactitud (Recuperación), incertidumbre e intervalo de trabajo.

-Cumplir con los objetivos de validación:

- Linealidad(Proporcionalidad):
  Pendiente= 0.8-1.2 y r≥0.9
- Límite de cuantificación:
  ≥ 5 UFC (Para la cepa de *Escherichia coli*)
  ≥ 7 UFC (Para la cepa de *Pseudomona aeruginosa*)
- Precisión:
  CV= ≤ 15 %
  RSD_R ≤ 3 % en todos los niveles
- Exactitud:
  Recuperación: ≥ 80 % y ≤ 110 % en los niveles superiores (A, B, C)
- Incertidumbre: ≤ 20 % U % (p= 95,5 %)
- Intervalo de trabajo: 5 a 10^3 U % 20 % (p= 95,5 %)

-Realizar un informe de validación en el que se determine la conformidad sobre la aptitud del método de ensayo.

1.5. Antecedentes

En el Ecuador existen doce laboratorios acreditados por el OAE (Organismo de Acreditación Ecuatoriano), para prestar los servicios de ensayos microbiológicos en aguas: cinco en Quito, cuatro en Guayaquil, uno en Francisco de Orellana, uno en Cuenca y uno en Chimborazo. De estos laboratorios siete tienen acreditado el método de filtración por membrana para la determinación de coliformes fecales y totales, sólo tres de estos laboratorios tiene acreditado este método para la determinación de *Escherichia coli* y solo un laboratorio está acreditado para determinar *Pseudomonas aeruginosa.*

En los laboratorios de ensayos de aguas de la sección departamental de Ingeniería Ambiental perteneciente a la UTPL, se realizan diferentes proyectos de investigación y de servicio de ensayos microbiológicos, tanto internos como externos en la modalidad de convenios siendo uno de los principales laboratorios que presta estos servicios en la región sur del país, por lo que se busca validar todos los métodos de ensayos que se realizan.

Con respecto a la filtración por membrana, es un método que es ampliamente usado a nivel nacional e internacional con porcentajes de recuperación muy efectivos y los métodos de ensayo para los parámetros de coliformes fecales, coliformes totales, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa,* están descritos en el *Standar Methods (métodos normalizados).*

Los parámetros que se propone validar, son los más importantes referidos a las normas vigentes para la calidad del agua en el Ecuador, como el Texto Unificado de Legislación Ambiental Secundaria (TULAS)[9]. Hay que mencionar que no existe gran información acerca de validación de métodos microbiológicos en el país, la mayoría de referencias de validaciones en laboratorios nacionales es de métodos fisicoquímicos, por ello como referencia de resultados microbiológicos se toma algunos trabajos similares realizados en Argentina (bajo la norma ISO)[6] y los resultados obtenidos durante todos los años que el laboratorio lleva prestando sus servicios, los cuales sirven como indicador para mejorar la calidad actual del método.

CAPÍTULO II
MARCO TEÓRICO

2.1. Calidad del agua

La presencia de bacterias patógenas en el agua destinada al consumo humano es un riesgo potencial permanente. La evidencia de que el agua contaminada puede ser una causa de varias enfermedades infecciosas conlleva a la necesidad de realizar ensayos microbiológicos de rutina en muestras de agua de diferente matriz, para saber si está apta para el consumo humano y si cumple con la normativa vigente[8, 9].

Para definir la calidad del agua, deben cumplirse ciertas normas básicas de calidad de tal manera que se cumpla con el objetivo de garantizar salubridad y proteger a las personas de los efectos adversos derivados de cualquier tipo de contaminación del agua destinadas al consumo humano.

- **Agua de consumo humano.**

Toda agua en su estado natural o después de tratamiento destinada al consumo directo, preparación de alimentos, higiene personal y cualquier otro uso doméstico habitual de los seres humanos[9].

- **Agua potable.**

Es el agua cuyas características físicas, químicas y microbiológicas han sido tratadas a fin de garantizar su aptitud para el consumo humano[11].

- **Agua natural.**

Es el agua que se encuentra en la naturaleza y que no ha recibido ningún tratamiento para modificar sus características: físicas, químicas o microbiológicas[9].

- **Agua residual.**

Las aguas de composición variada provenientes de las descargas de usos municipales, industriales, comerciales, de servicios agrícolas, pecuarios, domésticos, incluyendo fraccionamientos y en general de cualquier otro uso, que hayan sufrido degradación en su calidad original[9].

2.2. Análisis microbiológico del agua

Se define como análisis microbiológico a cada uno de los procedimientos que se efectúan a una muestra de agua para evaluar la presencia o ausencia, tipo y cantidad de microorganismos presentes en el agua[1].

- **Parámetros microbiológicos.**

El agua potable y natural deben cumplir con parámetros de inocuidad y el agua residual para su descarga debe estar dentro de un rango permitido de contaminación. A continuación se presentan 3 tablas, con los límites máximos permisibles de coliformes totales, coliformes fecales, *E. coli* y *Pseudomona aeuruginosa*, para agua de tipo potable, natural y residual (según su aplicación) basadas en la norma INEN y el libro VI del TULAS.

Tabla 1: Parámetros microbiológicos para agua potable

AGUA TRATADA Y DISTRIBUIDA	
Coliformes totales	**Ausencia en 100 mL**
Coliformes termotolerantes o *Escherichia coli*	**Ausencia en 100 mL**
Pseudomona aeruginosa	**Ausencia en 10 mL**
NOTA: Aunque *E.coli* es el indicador de contaminación fecal más preciso, el recuento de bacterias Coliformes termotolerantes es una opción aceptable. El volumen a analizar debe ser 100 mL por el método que se especifique en la sección correspondiente.	

Fuente: Requisitos Microbiológicos, de la Norma Técnica Ecuatoriana INEN

Tabla 2: Parámetros microbiológicos para agua natural

Requisito	Límite máximo
E. coli o termotolerantes coliformes bacterias, UFC/ 250 cm^3	1
Bacterias coliformes (total), UFC/ 250 cm^3	1
Estreptococos fecales, UFC/ 250 cm^3	1
Pseudomonas aeruginosa, UFC/ 250 cm^3	1
Bacterias anaerobias reductoras de sulfito, UFC/ 250 cm^3	1

Fuente: Requisitos Microbiológicos, de la Norma Técnica Ecuatoriana INEN

Tabla 3: Parámetros microbiológicos para agua residual (Descargas)

Parámetros	Expresado como	Unidad	Límite máximo permisible
Coliformes Fecales	Nmp/100 ml		[8]Remoción > al 99,9 %

Fuente: Libro VI, anexo 1 del Texto Unificado de Legislación Secundaria TULAS

2.3. Niveles de seguridad biológica

Existen 4 niveles establecidos según las técnicas utilizadas, los equipos de seguridad y la estructura del laboratorio[3].

- ✓ **Nivel 1:** Válido para laboratorios en los que se trabaja con microorganismos no patógenos bien conocidos y patógenos oportunistas. En este nivel es importante que las puertas del laboratorio permanezcan cerradas mientras se trabaja y que las mesas de trabajo se desinfecten continuamente además de las medidas de seguridad generales.

- ✓ **Nivel 2:** Permite el trabajo con microorganismos de peligrosidad potencial moderada. Comprende las normas del nivel 1 además de restringir el acceso al laboratorio solo a personal autorizado con el equipo de protección personal y nunca ingresar personas con inmunosupresión.

- ✓ **Nivel 3:** Este nivel es adecuado para trabajar con microorganismos de alto riesgo y comprende las normas de los niveles 1 y 2 además se restringe el trabajo solo dentro de la cabina de seguridad y se usa protección especial para este nivel.

- ✓ **Nivel 4:** Es el laboratorio de máxima seguridad, aquí generalmente se puede trabajar con ebola, virus, etc., comprende las medidas de seguridad de los niveles 1,2 y 3 pero su acceso y control es sumamente estricto.

2.4. Microorganismos indicadores

Varios organismos patógenos de contaminación fecal pueden estar presentes en el agua; la experiencia demuestra que la densidad del grupo coliformes es un indicador del grado de contaminación y por tanto de la calidad sanitaria[1].

- **Coliformes fecales.**

Las bacterias coliformes fecales forman parte del total del grupo coliforme. Son definidas como bacilos gram-negativos, no esporulados que fermentan la lactosa con producción de ácido y gas a 44.5 °C +/- 0.2 °C dentro de las 24 +/- 2 horas[1]. En la imagen 1 (abajo), se muestra una célula de coliforme fecal. Los coliformes fecales también denominados coliformes termo tolerantes porque soportan temperaturas hasta 45 ºC, comprenden un grupo menor de microorganismos, los cuales son indicadores de calidad ya que son de origen fecal[1].

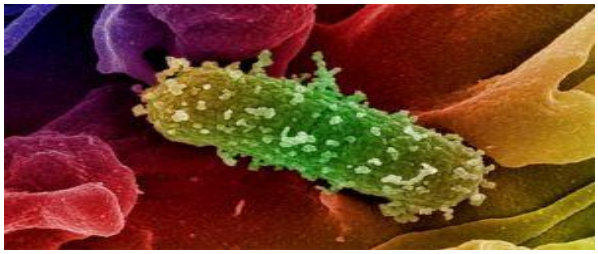


Imagen 1: Célula de coliforme fecal
Fuente: *Calidad del Agua*. Secretaria de medio ambiente y recursos naturales
Disponible en: www.semarnat.gob.mx

Los coliformes fecales integran el grupo de coliformes totales pero se diferencian de los demás microorganismos que hacen parte de este grupo, en que son Indol positivo, tienen un rango de temperatura de crecimiento óptima muy alto y son mejores indicadores de higiene. La presencia de estos microorganismos indica contaminación fecal de origen humano o animal, ya que son microorganismos de la flora intestinal[1].

Generalmente, las bacterias coliformes se encuentran en mayor abundancia en la capa superficial del agua o en los sedimentos del fondo[1].

Las bacterias coliformes fecales tienen un nivel de bioseguridad: Nivel 1,[3] que representa un nivel mínimo de peligro para la manipulación de este tipo de células.

- **Coliformes totales.**

Los coliformes totales son las Enterobacteriaceae lactosa-positivas y constituyen un grupo total de bacterias coliformes que se definen más por las pruebas usadas para su aislamiento que por criterios taxonómicos. Pertenecen a la familia Enterobacteriaceae y se caracterizan por su capacidad para fermentar la lactosa con producción de ácido y gas, en un periodo de 48 horas y con una temperatura de incubación comprendida entre 30-37 ºC.[1] En la siguiente imagen (imagen 2), se muestra un medio con crecimiento bacteriano de coliformes totales.

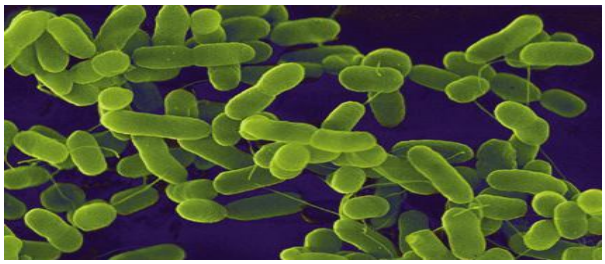


Imagen 2: Células de coliformes totales
Fuente: *Calidad del Agua*. Secretaria de medio ambiente y recursos naturales
Disponible en: www.semarnat.gob.mx

Son bacilos gram-negativos, aerobios y anaerobios facultativos, no esporulados. Del grupo coliforme forman parte varios géneros: Escherichia, Enterobacter, Klebsiella, Citrobacter, etc. Se encuentran en el intestino del hombre y de los animales, pero también en otros ambientes: agua, suelo, plantas, cascarones de huevo, etc[11].

Los coliformes totales se usan para evaluar la calidad de la leche pasteurizada, leche en polvo, helados, pastas frescas, pero también es un indicador para determinar la calidad bacteriológica de los efluentes de los sistemas de tratamiento de aguas servidas importante para evitar infecciones gastrointestinales[11].

Las bacterias coliformes totales tienen un nivel de bioseguridad: Nivel 1,[3] representa un nivel mínimo de peligro para la manipulación de este tipo de células.

- **Escherichia coli.**

Es una bacteria gram-negativa aerobia y anaerobia facultativa que no forma esporas. Esta es una especie de bacteria que vive en los intestinos de los animales de sangre caliente. En la imagen 3 se muestra algunas células de *E. coli*, son bacilos pequeños de 1.1 a 1.5 um de diámetro y de 2 a 6 um de longitud, se encuentran solos o en parejas, son móviles por flagelos perítricos o inmóviles; poseen metabolismo respiratorio y fermentativo[1].

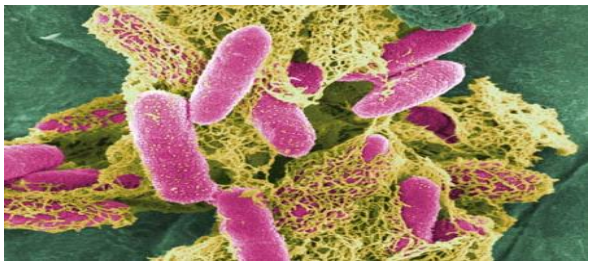


Imagen 3: Células de *Escherichia coli*
Fuente: *Calidad del Agua*. Secretaria de medio ambiente y recursos naturales
Disponible en: www.semarnat.gob.mx

Este microorganismo es una bacteria de control para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. También se usa para pruebas de susceptibilidad en disco de neomicina, kanamicina, cephalexina, gentamicina, tetraciclina. Se usa para su cultivo caldo soya tripticasa. Son capaces de producir Indol a partir de triptófano en 21 +/- 3 horas y a 44 +/- 0.5 ºC. Las condiciones para incubación son: temperatura de 37 ºC y por 24 horas en atmósfera aeróbica.

La bacteria de *E. Coli* presenta características bioquímicas importantes por ser positivo a la prueba de Indol, con lo que se diferencia de los otros coliformes[1].

Las bacterias de *E. coli* tienen un nivel de bioseguridad 1,[3] que representa un nivel mínimo de peligro para la manipulación de este tipo de células.

- **Pseudomona aeruginosa.**

Es un bacilo aerobio gram-negativo de rápido crecimiento, usado en medios para probar susceptibilidad antimicrobiana, en la evaluación con agar Mueller Hinton. Se usa para su cultivo caldo soya tripticasa o agar soya tripticasa. Las condiciones para incubación son a temperatura de 37 ºC en atmósfera aeróbica durante 24 horas[13].

Pseudomona aeruginosa secreta una variedad de pigmentos como piocianina (azul verdoso), fluoresceína (amarillo verdoso fluorescente) y piorubina (rojo pardo)[3].

En la siguiente imagen (imagen 4), se muestra el crecimiento selectivo de células de *Pseudomonas aeruginosa* con fluorescencia a la luz UV.

Imagen 4: Células de *Pseudomonas aeruginosa*
Fuente: Pseudomonas genome database
Disponible en: www.pseudomonas.com

Uno de los problemas de las aguas contaminadas con este tipo de microorganismos es las infecciones cutáneas que produce, que se caracterizan por tomar un color de fondo verde, en la imagen 5 se puede observar un cuadro de infección dérmica avanzado; este tipo de infección causa secuelas en muchos casos irreversibles[13].

Imagen 5: Infección dérmica por contagio con Pseudomonas
Fuente: Manual de Microbiología Medica[13]

Con relación a lo anterior las bacterias de *Pseudomona aeruginosa* tienen un nivel de bioseguridad 2,[3] es decir que representan un peligro considerable para su manipulación.

2.5. Filtración por membrana

Se basa en la filtración de una muestra de agua para concentrar células (bacterias) viables sobre la superficie de una membrana y transferirlas a un medio de cultivo apropiado para contar el número de unidades formadoras de colonias (UFC) desarrolladas luego de un período de incubación. La técnica de filtración por membrana utiliza un mecanismo mediante el cual se atrapan en la superficie de una membrana microorganismos cuyo tamaño es mayor que el poro de la membrana (0.45 um), esto gracias a una bomba eléctrica que ejerce una presión de vacío diferencial sobre la muestra de agua.

Las bacterias quedan en la superficie de la membrana y luego ésta es llevada a un medio enriquecido, selectivo o diferencial, entonces a través de un proceso de intercambio metabólico e incubación, se produce el crecimiento de microorganismos (UFC). Esta técnica es altamente reproducible y proporciona resultados cuantitativos, es una manera rápida y simple de estimar poblaciones bacterianas en agua y útil al momento de evaluar numerosas pruebas diarias[3].

- **Equipo de filtración.**

El equipo para filtración a través de membrana, consta de un equipo manifold o rampa de filtración [imagen 6], donde se soporta los filtros y embudos para hacer pasar las muestras de agua; este equipo está conectado a una bomba de vacio que produce la presión necesaria para la filtración.

Imagen 6: Equipo para filtración a través de membranas
Fuente: La Autora

- ***Kits de filtración.***

En este proyecto, se utilizaron kits de filtración NEOGEN [Imagen 7], los cuales constan de embudo, filtro y membrana, todo es desechable con lo que se evita la contaminación de las muestras al retirar la membrana con la pinza como sucede con el sistema anterior.

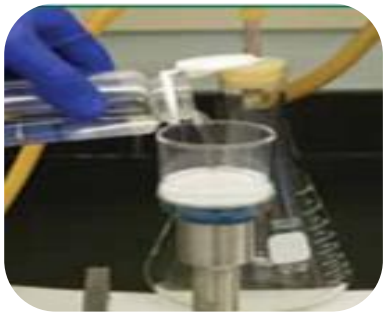


Imagen 7: Kit de filtración desechable
Fuente: La Autora

- ***Medios de cultivo.***

Un medio de cultivo es un sustrato o solucion de nutrientes en donde crecen y se multiplican los microorganismos, con el objetivo de aislar diferentes especies de microorganismos. De la inocuidad y de la capacidad de recuperación del medio, depende en gran parte los resultados de un ensayo microbiológico[3].

Los medios de cultivo se clasifican tomando en cuenta su estado físico en: Solidos, semisólidos y líquidos; y según su finalidad en medios selectivos, no selectivos, enriquecidos y diferenciales[3]. En la imagen 8 se muestran ejemplos de ampollas de 2 ml de medios de cultivo selectivos.

Imagen 8: Medios de cultivo seleccionados en ampollas de 2ml
Fuente: La Autora

La composición quimica de los medios de cultivo provee los requerimientos nutricionales básicos para el crecimiento de los microrganismos. Por lo que debe cumplir con dos características: selectividad y productividad, por ello siempre se recomienda usar medios ya preparados[3].

2.6. Validación de métodos microbiológicos

- **Validación.**

Confirmación mediante el aporte de pruebas objetivas, de que se han cumplido los requisitos para el uso pretendido o una aplicación específica[14].

- **Validación secundaria.**

Demostración por experimento de que un método establecido, funciona de acuerdo con las especificaciones en las manos del laboratorista[14].

- **Parámetros de validación.**

Son aquellas características del método para las que se definen requisitos, se realizan experimentos para obtenerlos y se valoran los resultados obtenidos frente a los requisitos para poder declarar validado el método[3].

- ✓ ***Incertidumbre.***

Parámetro asociado al resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que razonablemente podrían ser atribuidos al mesurando.

- ✓ **Intervalo de Trabajo.**

Intervalo comprendido entre las concentraciones superior e inferior (incluidas), y para las que se ha demostrado que el analito es cuantificado con un nivel satisfactorio de recuperación, linealidad y repetibilidad.

- ✓ ***Límite de cuantificación.***

Concentración más baja a la cual el analito que puede cuantificarse con una precisión aceptable, bajo las condiciones experimentales establecidas

- ✓ ***Límite de detección.***

Menor cantidad o concentración de un analito que puede detectarse de manera fiable o diferencia por un método específico.

- ✓ ***Linealidad.***

Habilidad del método para obtener resultados de la prueba proporcionales a la concentración del analito.

- ✓ ***Recuperación.***

Cantidad del analito recuperada en la porción de muestra o muestra adicionada, permite evaluar la eficiencia del método.

- ✓ ***Repetibilidad.***

Precisión de medida bajo un conjunto de condiciones de repetibilidad[6].

- ✓ ***Reproducibilidad.***

Precisión de medida bajo un conjunto de condiciones de reproducibilidad. Este conjunto de condiciones incluye diferentes lugares, operadores, sistemas de medida y mediciones repetidas de los mismos objetos u objetos similares[6].

- ✓ ***Robustez.***

Capacidad de un método para mantenerse sin cambios ante pequeñas pero deliberadas variaciones en los parámetros del método, que provee una indicación de su confiabilidad durante el uso normal[6].

- ✓ **Sesgo.**

Sesgo o ¨Bias¨ es la diferencia entre el valor promedio obtenido de los resultados de prueba con respecto a un valor de referencia aceptado o conocido.

- ✓ ***Veracidad.***

Se define como el grado de concordancia entre el valor obtenido de una concentración o cantidad medida y el valor teórico de la misma. La veracidad (de un método) es una expresión de que tan cercana se encuentra la media de un conjunto de resultados (producidos por el método) respecto al valor real.

CAPÍTULO III
METODOLOGÍA

3.1. Generalidades

En el presente trabajo, se realiza la validación de los métodos microbiológicos de filtración por membrana para la determinación de los parámetros de *Escherichia coli*, coliformes fecales, coliformes totales y *Pseudomona aeruginosa*. Los ensayos se realizan en las matrices seleccionadas de: agua natural, agua potable y agua residual, a las cuales se les siembra un inoculo conocido para luego evaluar el porcentaje de recuperación obtenido.

El primer paso es el proceso de activación de las cepas de microorganismos, en este caso las cepas de células seleccionadas: *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853, se las obtuvo en una presentación Duo Pack y la activación se ejecuta con un simple paso de mezclado dentro del mismo empaque el hisopo con el caldo revividor, luego se estría el hisopo en cajas petri con agar Plate count, se deja sedimentar y se coloca en la incubadora a 35 ºC por 24 - 48 horas.

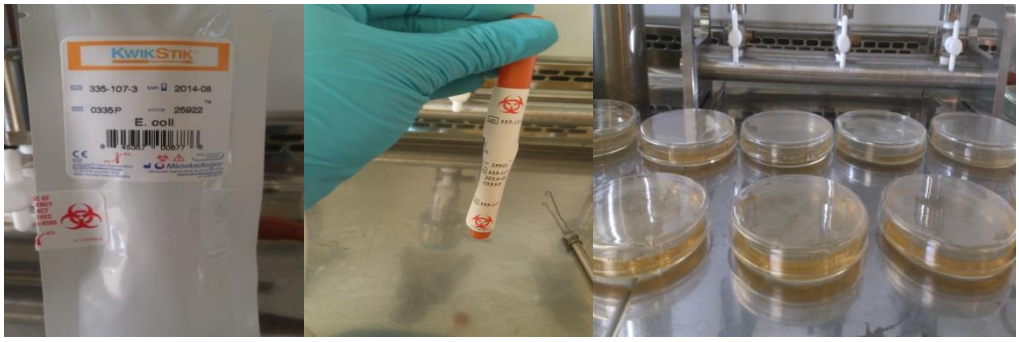


Imagen 9: Proceso para la activación de cepas bacterianas en presentación ¨STIK¨
Fuente: La Autora

Luego de que pasa el tiempo de incubación (no más de 48h), con las cepas de microorganismos activas se procede a realizar la estandarización del tubo 0.5 (patrón de referencia de la escala de Mcfarland) y ensayos preliminares con el fin de obtener dominio del método.

3.2. Estándar nefelométrico de Mcfarland

La escala de Mcfarland provee una referencia de estandarización de la suspensión bacteriana, usada para pruebas donde se requiera inocular un inoculo.
Preparar 10 tubos de ensayo de igual tamaño y buena calidad, deben estar perfectamente limpios. Preparar ácido sulfúrico al 1% y una solución acuosa de cloruro de bario al 1%. Colocar en los tubos las cantidades de cada solución indicada en el siguiente cuadro [tabla

4], completando 10 ml por tubo y una vez concluido sellar los tubos y guardar en la oscuridad. La suspensión de sulfato de bario formada corresponde aproximadamente, en el intervalo del estándar, a las concentraciones de una suspensión homogénea de bacteria como se indica en la siguiente tabla:

Tabla 4: Concentraciones para estandarización del tubo 0.5 de la escala de Mcfarland.

N. de tubos	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**
Cl_2Ba (ml)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
H_2SO_4 (ml)	9.9	9.8	9.7	9.6	9.5	9.4	9.3	9.2	9.1	9.0
Densidad celular (x10^8UFC)	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30

Fuente: La autora

Luego se prepararon suspensiones de bacterias para cada nivel de ensayo y se los comparó con el tubo 0.5 de la escala de Mcfarland, para esto se prepararon 18 tubos de ensayo con BHI con volúmenes de 9 y 9.9 ml. Con un aza se transfirió una pequeña cantidad de bacteria a un vial con BHI (Imagen 10) se agitó para obtener la turbiedad equivalente al tubo 0.5. Para comprobar la densidad se midió la absorbancia a 625nm (Referencia del Instituto de estándares para laboratorios y clínicas). El valor de la absorbancia debe estar entre 0.08-0.13, aquí nuestro inoculo corresponde a 10^8UFC y de aquí transferimos diluciones hasta llegar a una concentración de 10^3UFC, que será nuestra concentración mayor.

Imagen 10: Preparación de suspensión bacteriana 10^8 y verificación de densidad bacteriana midiendo la absorbancia a 625 nm.
Fuente: La Autora.

3.3. Preparación de los inóculos bacterianos

Con un volumen de 60 ml de suspensión bacteriana 10^3 UFC se realiza suspensiones en BHI hasta llegar a una concentración final teórica de 0 UFC, en cada nivel se debe sembrar 1 ml por vertido en agar Plate count para verificar el valor real de UFC que se está inoculando. Con estas suspensiones se transfiere 0.5 ml a tubos ependorf o tubos criogénicos y se les

añadió una infusión (0.5 ml), de cerebro-corazón y glicerina (con el objetivo de prolongar el tiempo de vida de las bacterias).

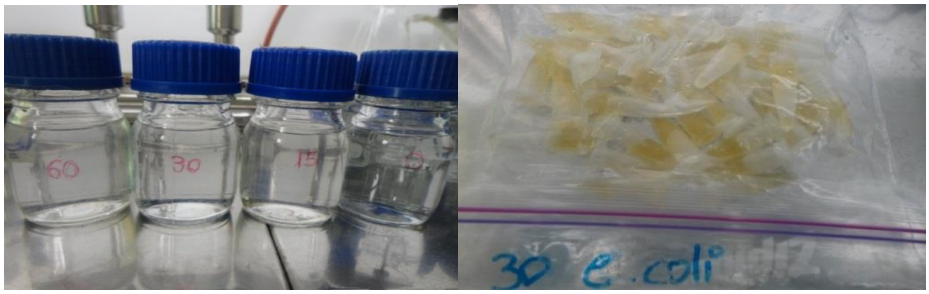


Imagen 11: Preparación y almacenamiento de niveles de trabajo
Fuente: La Autora

3.4. Diseño de validación

Primero se ejecuta una lectura del crecimiento bacteriano con cuatro niveles de concentración: Dilución 10^{-5} A 60 - B 30 - C 15 - D 0 UFC a partir de un estándar nefelométrico 0.5 de la escala de Mcfarland, por cinco veces en cada nivel en condiciones de repetibilidad.

La validación consiste en verificar que el valor teórico de lectura del estándar nefelométrico 0,5 en la dilución 10^{-5} y sus diluciones posteriores sean cuantificadas por los equipos establecidos en las condiciones determinadas por el método propuesto.
Luego se hará una determinación de la exactitud (recuperación) a través de las diluciones en los niveles A, B, C y D. La validación se hace en base a este diseño, durante tres días distintos en condiciones de reproducibilidad.

3.5. Procedimientos

A continuación se describen los procedimientos del protocolo de validación necesarios para la determinación por medio del método de filtración por membrana de: coliformes fecales, totales, *E. coli* y *Pseudomona aeruginosa*, aplicables a la matriz de agua potable, natural y residual. El método aplicado es el mismo en cada ensayo, la diferencia en el proceso es el tipo de medio de cultivo usado, el tiempo y temperatura de incubación y los criterios de confirmación de los microorganismos.

DETERMINACIÓN DE COLIFORMES FECALES

1. Objeto

El presente procedimiento tiene por objeto describir las actividades que se realizan para la determinación cuantitativa de coliformes fecales en aguas.

2. Alcance

Este procedimiento es aplicable para agua de tipo natural, potable y residual; para la determinación de coliformes fecales mediante la técnica de filtración por membrana.

3. Descripción del tipo de Item

Las muestras de agua.

4. Principio

Son bacterias gram-negativas no esporuladas, capaces de fermentar la lactosa con producción de ácido y gas a las 24 +/- 2 horas de incubación a 44.5 +/- 0.2 ºC. Son microorganismos indicadores de la calidad del agua.

5. Fundamento

El método de filtración por membrana para coliformes fecales, se basa en hacer pasar la muestra de agua problema a través de un filtro de membrana microporosa, en cuya superficie quedan retenidos los microorganismos. Luego se debe incubar la membrana sobre un medio de cultivo selectivo para coliformes fecales (m-FC), a la temperatura de 44.5 ºC +/- 0.2 ºC y durante el tiempo de 24 horas, para posteriormente contar las colonias directamente de la superficie de la membrana.

6. Condiciones ambientales

Temperatura: 18 – 24 ºC

Humedad Relativa: 45 – 65 %

7. Medidas de seguridad

- Ingresar al laboratorio con mandil limpio y desinfectarse los zapatos.
- Trabajar con guantes desinfectados, gorro y mascarilla.
- Incinerar, agujas, azas de platino después de haber terminado el trabajo.
- No ingresar con alimentos.

- Las pipetas que han sido utilizadas después de la siembra se las debe sumergir en agua con cloro.
- Tener mucha precaución al trabajar con las cepas de microorganismos, siempre manipularlas dentro de la cámara de seguridad.
- Mantener la puerta del laboratorio cerrada.

8. Equipos, materiales y reactivos

8.1. Equipos.

- Equipo de porta filtro de acero inoxidable de 3 tomas
- Colector de filtración de tres puestos de acero inoxidable
- Dos matraces (500 y 1000 ml)
- Dos tubos de vacío
- Filtros con soporte y pinza
- Bomba de vacío
- Incubadora
- Contador de colonias
- Cámara de seguridad Biológica 2B2
- Incinerador de azas

8.2. Materiales.

- Pipetas de 10, 5, 2, 1 ml
- Pinzas
- Botellas de dilución
- Embudos de filtración esteriles con su respectiva membrana, caja petri y filtro

8.3. Reactivos, patrones de referencia y material de referencia.

- Medio de cultivo certificado m-FC
- KH_2PO_4 en grado reactivo
- Cepa de referencia *E. coli* certificada: ATCC 25922
- Agua esteril
- Solucion Stock: Agua buferada preparada con KH_2PO_4

Preparación: Se disuelve 34,0 g de KH_2PO_4 en 500 ml de agua, se ajusta el pH a 7,2 con aproximadamente 1,75 ml de NaOH 1M, y diluir a 1 L. Mantener en refrigeración. Diluyente: Diluir 1,25 ml de la solución stock a 1 L con agua. Prepare blancos de dilución con esta solución. Autoclavar 15 minutos a 121 ºC.

9. Descripción del procedimiento

Para iniciar el procedimiento se debe realizar una desinfección del área de trabajo y colocar todo en orden con sus respectivas identificaciones.

9.1. Manipulación de los items de ensayo.

Mantener los medios de cultivo a menos 8 ºC, usarlas antes de la fecha de caducidad impresa en la bolsa. Para cerrar las bolsas, doblar los extremos y verificar que estén bien cerradas. Mantener las bolsas cerradas de nuevo a menos 21 ºC a 50 % de HR (humedad relativa). Usar los medios de cultivo verificando que la tapa esté sellada. Luego de usar los medios de cultivo destruirlos a 121 ºC por 15 minutos.

9.2. Selección del tamaño de la muestra.

El tamaño de la muestra está representado por la densidad bacteriana esperada. Analizando agua de bebida el tamaño de la muestra será limitado por el grado de turbiedad o por el crecimiento del coliforme en el medio. Para los propósitos de la regulación 100 ml es el tamaño de la muestra oficial. Un volumen de la muestra ideal rendirá de 20 a 80 colonias de coliformes y no más de 200 colonias de cualquier tipo en una superficie de filtración por membrana. Analizar filtrando agua de bebida de 100 a 1000 ml o filtrando volúmenes pequeños de muestra como duplicado de 50 a 1000 ml o filtrando volúmenes más pequeños de muestra como duplicado de 50 ml o 4 porciones de 25 ml. Analice filtrando otras aguas en volúmenes diferentes (diluidos o puros) dependiendo de la densidad bacteriana esperada.

9.3. Filtración de la muestra.

El proceso inicia armando el equipo de filtración: cada manifold con su respectivo kit de filtración, para esto se utiliza embudos de filtración con su propia membrana y filtro con lo que se reduce el contacto y contaminación de la muestra; se agita la muestra en su propio recipiente y añada al embudo. Siempre se debe verter un volumen conocido de muestra con la mayor precisión posible. Conecte el vacío y filtre la muestra. Si el volumen es menor a 100 ml se agita suavemente el portafiltros mientras se filtra. Lave las paredes del embudo con una solución tamponada estéril, deje filtrar esta solución.

9.4. Adición del medio de cultivo.

Una vez que ha pasado toda la muestra de agua, se desconecta el vacío y abra la ampolla de 2 ml del medio m-FC y vierta sobre el pad absorbente distribuyendo por toda la superficie. Se desprende la parte inferior del embudo que es la caja petri, se la tapa y marca adecuadamente para su posterior identificación. El medio de cultivo a emplear es el m-FC, compuesto por lactosa, proteínas, vitaminas, reactivo de Schiff y otros reactivos. En presencia de coliformes, la fermentación de la lactosa produce CO_2 y acido. El medio reacciona formando colonias típicas azules

9.5. Incubación.

Invierta la caja petri (para evitar que el vapor condensado caiga sobre la superficie de la membrana) e incube durante el tiempo y la temperatura adecuada de 24 +/- 2 horas a 44.5 +/- 0.2 ºC.

9.6. Conteo de colonias.

Extraiga la caja petri de la incubadora y cuente las colonias típicas que presente el aspecto característico de coliformes fecales, son colonias positivas de coliformes las colonias de color azul.

9.7. Verificación de colonias.

Se debe verificar las colonias positivas presuntivas de coliformes fecales.

Se verifican las colonias típicas azules y atípicas de color gris a verde. Para agua potable verificar por lo menos 5 colonias sospechosas y 5 colonias típicas que hayan crecido en la membrana. Para muestras de agua natural o residual, verificar por lo menos una vez al mes 10 colonias sospechosas.

9.8. Cálculo de la densidad de coliformes.

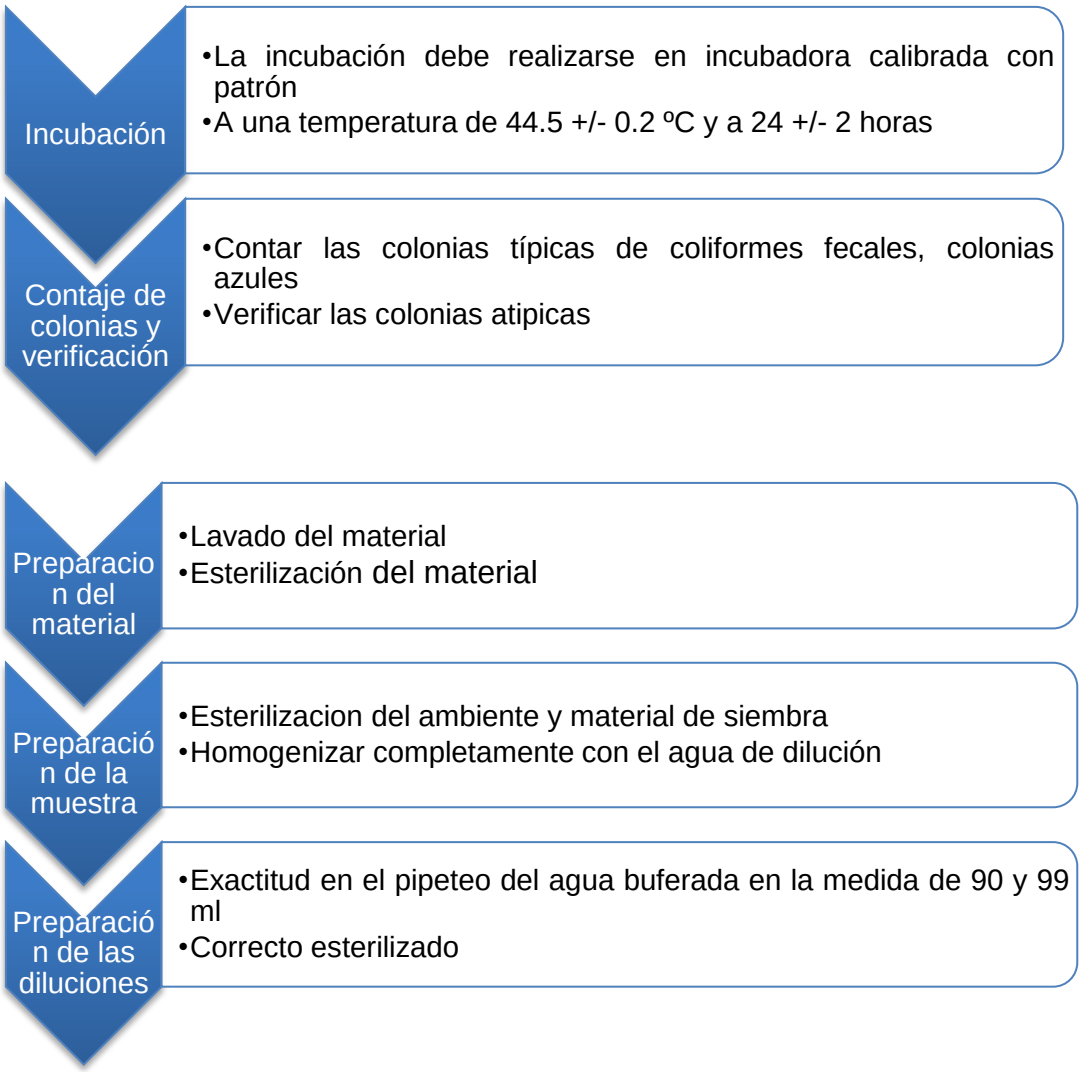
Se expresa los resultados en número de coliformes fecales por cada 100 ml de muestra original. En el caso en que no se haya filtrado los 100 ml de muestra, multiplique el recuento obtenido por 100 y dividido para el número de mililitros de muestra que filtró.

$$Colonias/100 = \frac{colonias\ de\ coliformes\ contadas\ x\ 100}{\text{ml de muestra filtrada}}$$

9.9. Interpretación y resultados.

Exprese los resultados en número de coliformes fecales por cada 100 ml de muestra original. En el caso en que no se haya filtrado los 100 ml de muestra multiplique el recuento obtenido por 100 y dividido para el número de mililitros de muestra que filtró.

9.10. Diagrama de puntos críticos.



9.11. Imágenes de referencia.

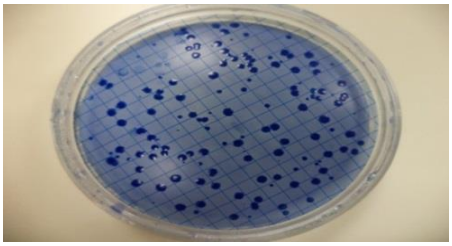


Imagen 12: Caja petri con colonias típicas de coliformes fecales
Fuente: La Autora

10. Eliminación de residuos

Los residuos se eliminan en la autoclave de deshecho por 15 minutos a 15 psi, poniendo la cinta de esterilización para comprobar la temperatura y presión. Una vez destruidos se los puede desechar en la basura común.

11. Fórmula de cálculo

Para realizar el recuento de coliformes fecales se utiliza la siguiente fórmula:

$$\boxed{Recuento\ de\ coliformes\ fecales = N.de\ colonias\ contadas * inverso\ de\ la\ dilución}$$

12. Autocontrol y aseguramiento de la calidad

El autocontrol y aseguramiento de la calidad se realiza con recuperación, utilizando una suspensión de la bacteria *E. coli* (ATCC 25922). El criterio de aceptación es que la recuperación debe estar del 80 – 110 %.

13. Criterios de aceptación y rechazo

- Los criterios de aceptación y rechazo para los duplicados es de ± 5 %
- Los blancos de medios de cultivo, aguas de dilución deben ser igual a cero, de lo contrario repetir el ensayo

14. Expresión de los resultados

Los resultados se expresan en UFC/100 ml de agua

15. Bibliografía

Standar Methods for the Examination of Water and Wastewater, Method 9230 C. Membrane Filter Technique for Coliform faecal method 2012, Edition 22.

DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES

1. Objeto

El presente procedimiento tiene por objeto describir las actividades que se realizan para la determinación cuantitativa de coliformes totales en aguas.

2. Alcance

Este procedimiento es aplicable para agua de tipo natural, potable y residual; para la determinación de coliformes totales mediante la técnica de filtración por membrana.

3. Descripción del tipo de Item

Las muestras de agua.

4. Principio

El grupo coliforme está constituido por bacterias gram-negativas capaces de fermentar la lactosa con producción de gas a las 48 horas de incubación a 35 ºC. Este grupo está conformado por cuatro géneros principalmente: Escherichia, Enterobacter, Citrobacter y Klebsiella. Pueden utilizarse para evaluar la calidad microbiológica del mismo

5. Fundamento

El método de filtración por membrana para coliformes totales, se basa en hacer pasar la muestra de agua problema a través de un filtro de membrana microporosa, en cuya superficie quedan retenidos los microorganismos. Bastará incubar la membrana sobre un medio de cultivo m-COLIBLUE BROTH, a la temperatura de 35 +/- 0.5 ºC y durante el tiempo de 18 a 24 horas, para posteriormente contar las colonias directamente de la superficie de la membrana.

6. Condiciones ambientales

Temperatura: 18 – 24 ºC

Humedad Relativa: 45 – 65 %

7. Medidas de seguridad

- Ingresar al laboratorio con mandil limpio y desinfectarse los zapatos.
- Trabajar con guantes desinfectados, gorro y mascarilla.
- Incinerar, agujas, azas de platino después de haber terminado el trabajo.
- No ingresar con alimentos.

- Las pipetas que han sido utilizadas después de la siembra se las debe sumergir en agua con cloro.
- Tener mucha precaución al trabajar con las cepas de microorganismos, siempre manipularlas dentro de la cámara de seguridad.
- Mantener la puerta del laboratorio cerrada.

8. Equipos, materiales y reactivos

8.1. Equipos.

- Equipo de porta filtro de acero inoxidable de 3 tomas
- Colector de filtración de tres puestos de acero inoxidable
- Dos matraces (500 y 1000 ml)
- Dos tubos de vacío
- Filtros con soporte y pinza
- Bomba de vacío
- Incubadora
- Contador de colonias
- Cámara de seguridad Biológica 2B2
- Incinerador de azas

8.2. Materiales.

- Pipetas de 10, 5, 2, 1 ml
- Pinzas
- Botellas de dilución
- Embudos de filtración esteriles con su respectiva membrana, caja petri y filtro

8.3. Reactivos, patrones de referencia y material de referencia.

- Medio de cultivo certificado m-COLIBLUE BROTH
- KH_2PO_4 en grado reactivo
- Cepa de referencia *E. coli* certificada: ATCC 25922
- Agua esteril
- Solucion Stock: Agua buferada preparada con KH_2PO_4

Preparación: Se disuelve 34,0 g de KH_2PO_4 en 500 ml de agua, se ajusta el pH a 7,2 con aproximadamente 1,75 ml de NaOH 1M, y diluir a 1 L. Mantener en refrigeración. Diluyente: Diluir 1,25 ml de la solución stock a 1 L con agua. Prepare blancos de dilución con esta solución. Autoclavar [15] minutos a 121 ºC.

9. Descripción del procedimiento

Para iniciar el procedimiento se debe realizar una desinfección del área de trabajo y colocar todo en orden con sus respectivas identificaciones.

9.1. Manipulación de los items de ensayo.

Mantener los medios de cultivo a menos 8 ºC, usarlas antes de la fecha de caducidad impresa en la bolsa. Para cerrar las bolsas, doblar los extremos y verificar que estén bien cerradas. Mantener las bolsas cerradas de nuevo a menos 21 ºC a 50 % de HR (humedad relativa). Usar los medios de cultivo verificando que la tapa esté sellada. Luego de usar los medios de cultivo destruirlos a 121 ºC por 15 minutos.

9.2. Selección del tamaño de la muestra.

El tamaño de la muestra está representado por la densidad bacteriana esperada. Analizando agua de bebida el tamaño de la muestra será limitado por el grado de turbiedad o por el crecimiento del coliforme en el medio. Para los propósitos de la regulación 100 ml es el tamaño de la muestra oficial. Un volumen de la muestra ideal rendirá de 20 a 80 colonias de coliformes y no más de 200 colonias de cualquier tipo en una superficie de filtración por membrana. Analizar filtrando agua de bebida de 100 a 1000 ml o filtrando volúmenes pequeños de muestra como duplicado de 50 a 1000 ml o filtrando volúmenes más pequeños de muestra como duplicado de 50 ml o 4 porciones de 25 ml. Analice filtrando otras aguas en volúmenes diferentes (diluidos o puros) dependiendo de la densidad bacteriana esperada.

9.3. Filtración de la muestra.

El proceso inicia armando el equipo de filtración: cada manifold con su respectivo kit de filtración, para esto se utiliza embudos de filtración con su propia membrana y filtro con lo que se reduce el contacto y contaminación de la muestra; se agita la muestra en su propio recipiente y añada al embudo. Siempre se debe verter un volumen conocido de muestra con la mayor precisión posible. Conecte el vacío y filtre la muestra. Si el volumen es menor a 100 ml se agita suavemente el portafiltros mientras se filtra. Lave las paredes del embudo con una solución tamponada estéril, deje filtrar esta solución.

9.4. Adición del medio de cultivo.

Una vez que ha pasado toda la muestra de agua, se desconecta el vacío y abra la ampolla de 2 ml del medio a usar y vierta sobre el pad absorbente distribuyendo por toda la superficie. Se desprende la parte inferior del embudo que es la caja petri, se la tapa y marca adecuadamente para su posterior identificación. El medio de cultivo a emplear es el m-COLIBLUE BROTH, compuesto por lactosa, proteínas, vitaminas, reactivo de Schiff y otros reactivos. En presencia de coliformes, la fermentación de la lactosa produce CO_2 y acido. El medio reacciona formando colonias típicas azules

9.5. Incubación.

Invierta la caja petri (para evitar que el vapor condensado caiga sobre la superficie de la membrana) e incube durante el tiempo y la temperatura adecuada de 18 a 24 horas a 35 +/- 0.5 ºC.

9.6. Conteo de colonias.

Extraiga la caja petri de la incubadora y cuente las colonias típicas que presente el aspecto característico de coliformes totales, son colonias positivas las colonias de color rosadas a rojas obscuras con brillo metálico.

9.7. Verificación de colonias.

Se debe verificar las colonias positivas presuntivas de coliformes totales.

Se verifican las colonias atípicas rojas y que no presenten brillo metálico. Para agua potable verificar por lo menos 5 colonias sospechosas y 5 colonias típicas que hayan crecido en la membrana. Para muestras de agua natural o residual, verificar por lo menos una vez al mes 10 colonias sospechosas.

9.8. Cálculo de la densidad de coliformes.

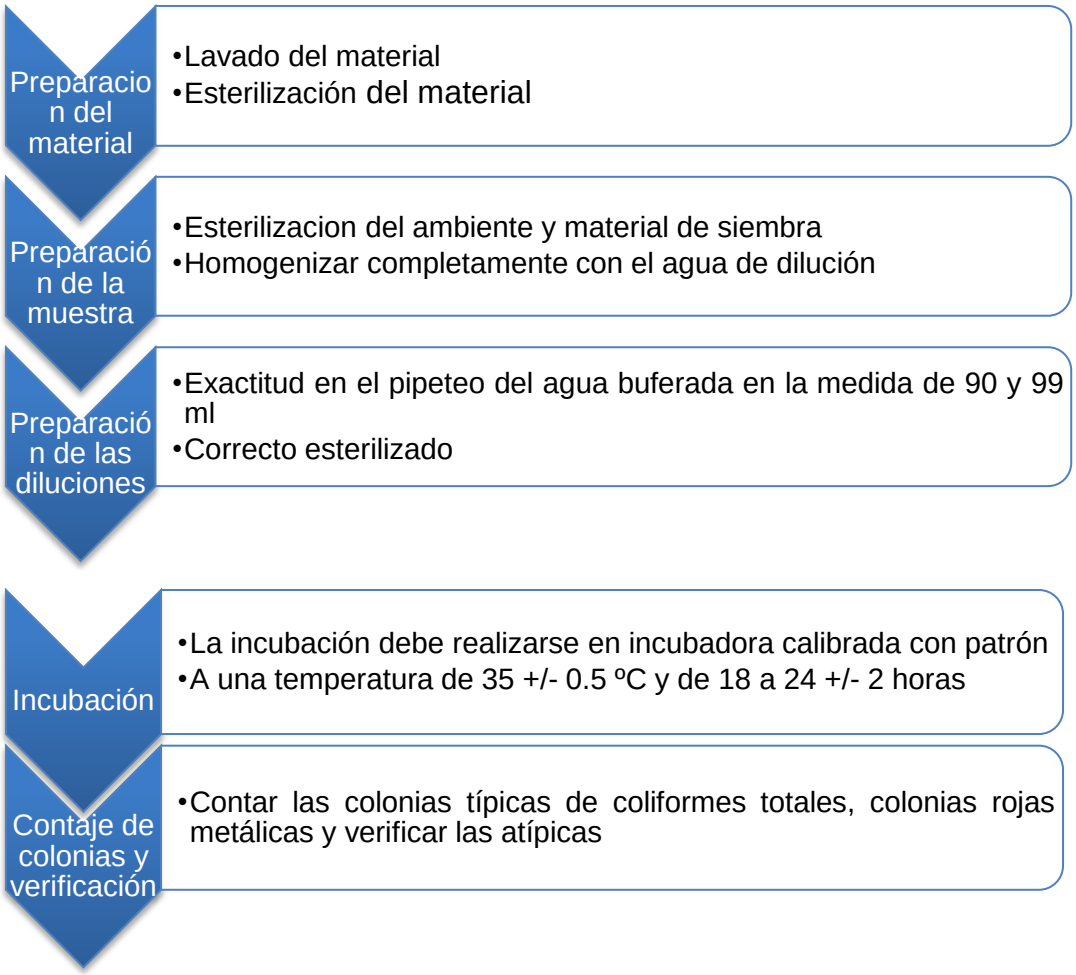
Se expresa los resultados en número de coliformes totales por cada 100 ml de muestra original. En el caso en que no se haya filtrado los 100 ml de muestra, multiplique el recuento obtenido por 100 y dividido para el número de mililitros de muestra que filtró.

$$Colonias/100 = \frac{colonias\ de\ coliformes\ contadas\ x\ 100}{\text{ml de muestra filtrada}}$$

9.9. Interpretación y resultados.

Exprese los resultados en número de coliformes totales por cada 100 ml de muestra original. En el caso en que no se haya filtrado los 100 ml de muestra multiplique el recuento obtenido por 100 y dividido para el número de mililitros de muestra que filtró.

9.10. Diagrama de puntos críticos.



9.11. Imagen de referencia.

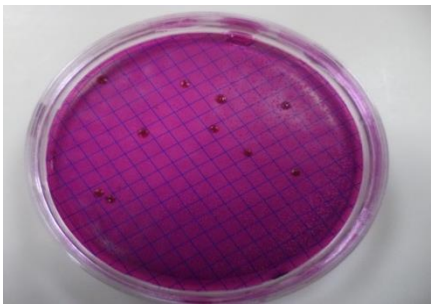


Imagen 13: Caja petri con colonias típicas de coliformes totales

Fuente: La Autora

10. Eliminación de residuos

Los residuos se eliminan en la autoclave 15 minutos a 15 psi, poniendo la cinta de esterilización para comprobar la temperatura y presión. Una vez destruidos se los puede desechar en la basura común.

11. Fórmula de cálculo

Para realizar el recuento de coliformes totales se utiliza la siguiente fórmula:

$$\boxed{Recuento\ de\ coliformes\ totales = N.de\ colonias\ contadas * inverso\ de\ la\ dilución}$$

12. Autocontrol y aseguramiento de la calidad

El autocontrol y aseguramiento de la calidad se realiza con recuperación, utilizando una suspensión de la bacteria *E. coli* (ATCC 25922). El criterio de aceptación es que la recuperación debe estar del 80 – 110 %.

13. Criterios de aceptación y rechazo

- Los criterios de aceptación y rechazo para los duplicados es de ± 5 %
- Los blancos de medios de cultivo, aguas de dilución deben ser igual a cero, de lo contrario repetir el ensayo

14. Expresión de los resultados

Los resultados se expresan en UFC/100 ml de agua

15. BIBLIOGRAFÍA

Standar Methods for the Examination of Water and Wastewater. Method 9222 B. Membrane Filter Technique for Coliform Total method 2012, Edition 22.

DETERMINACIÓN DE *ESCHERICHIA COLI*

1. Objeto

El presente procedimiento tiene por objeto describir las actividades que se realizan para la determinación cuantitativa de *Escherichia coli* en aguas.

2. Alcance

Este procedimiento es aplicable para agua de tipo natural, potable y residual; para la determinación de *Escherichia coli* mediante la técnica de filtración por membrana.

3. Descripción del tipo de Item

Las muestras de agua.

4. Principio

La *E. Coli* es una bacteria gram-negativa aerobia y anaerobia facultativa que no forma esporas. Ésta es una especie de bacteria que vive en los intestinos de los animales de sangre caliente y pueden utilizarse para evaluar la calidad microbiológica del agua.

5. Fundamento

El método de filtración por membrana para *E. Coli*, se basa en hacer pasar la muestra de agua problema a través de un filtro de membrana microporosa, en cuya superficie quedan retenidos los microorganismos. Bastará incubar la membrana sobre un medio de cultivo Medio de cultivo m-COLIBLUE BROTH, a la temperatura de 35 +/- 0.5 ºC y durante el tiempo de 24 +/- 4 horas, para posteriormente contar las colonias directamente de la superficie de la membrana.

6. Condiciones ambientales

Temperatura: 18 – 24 ºC

Humedad Relativa: 45 – 65 %

7. Medidas de seguridad

- Ingresar al laboratorio con mandil limpio y desinfectarse los zapatos.
- Trabajar con guantes desinfectados, gorro y mascarilla.
- Incinerar, agujas, azas de platino después de haber terminado el trabajo.
- No ingresar con alimentos.

- Las pipetas que han sido utilizadas después de la siembra se las debe sumergir en agua con cloro.
- Tener mucha precaución al trabajar con las cepas de microorganismos, siempre manipularlas dentro de la cámara de seguridad.
- Mantener la puerta del laboratorio cerrada.

8. Equipos, materiales y reactivos

8.1. Equipos.

- Equipo de porta filtro de acero inoxidable de 3 tomas
- Colector de filtración de tres puestos de acero inoxidable
- Dos matraces (500 y 1000 ml)
- Dos tubos de vacío
- Filtros con soporte y pinza
- Bomba de vacío
- Incubadora
- Contador de colonias
- Cámara de seguridad Biológica 2B2
- Incinerador de azas

8.2. Materiales.

- Pipetas de 10, 5, 2, 1 ml
- Pinzas
- Botellas de dilución
- Embudos de filtración esteriles con su respectiva membrana, caja petri y filtro

8.3. Reactivos, patrones de referencia y material de referencia.

- Medio de cultivo certificado m-COLIBLUE BROTH
- KH_2PO_4 en grado reactivo
- Cepa de referencia *E. coli* certificada: ATCC 25922
- Agua esteril
- Solucion Stock: Agua buferada preparada con KH_2PO_4

Preparación: Se disuelve 34,0 g de KH_2PO_4 en 500 ml de agua, se ajusta el pH a 7,2 con aproximadamente 1,75 ml de NaOH 1M, y diluir a 1 L. Mantener en refrigeración. Diluyente: Diluir 1,25 ml de la solución stock a 1 L con agua. Prepare blancos de dilución con esta solución. Autoclavar 15 minutos a 121 ºC.

9. Descripción del procedimiento

Para iniciar el procedimiento se debe realizar una desinfección del área de trabajo y colocar todo en orden con sus respectivas identificaciones.

9.1. Manipulación de los items de ensayo.

Mantener los medios de cultivo a menos 8 ºC, usarlas antes de la fecha de caducidad impresa en la bolsa. Para cerrar las bolsas, doblar los extremos y verificar que estén bien cerradas. Mantener las bolsas cerradas de nuevo a menos 21 ºC a 50 % de HR (humedad relativa). Usar los medios de cultivo verificando que la tapa esté sellada. Luego de usar los medios de cultivo destruirlos a 121 ºC por 15 minutos.

9.2. Selección del tamaño de la muestra.

El tamaño de la muestra está representado por la densidad bacteriana esperada. Analizando agua de bebida el tamaño de la muestra será limitado por el grado de turbiedad o por el crecimiento de *E. coli* en el medio. Para los propósitos de la regulación 100 ml es el tamaño de la muestra oficial. Un volumen de la muestra ideal rendirá de 20 a 80 colonias de *E. coli* y no más de 200 colonias de cualquier tipo en una superficie de filtración por membrana. Analizar filtrando agua de bebida de 100 a 1000 ml o filtrando volúmenes pequeños de muestra como duplicado de 50 a 1000 ml o filtrando volúmenes más pequeños de muestra como duplicado de 50 ml o 4 porciones de 25 ml. Analice filtrando otras aguas en volúmenes diferentes (diluidos o puros) dependiendo de la densidad bacteriana esperada.

9.3. Filtración de la muestra.

El proceso inicia armando el equipo de filtración: cada manifold con su respectivo kit de filtración, para esto se utiliza embudos de filtración con su propia membrana y filtro con lo que se reduce el contacto y contaminación de la muestra; se agita la muestra en su propio recipiente y añada al embudo. Siempre se debe verter un volumen conocido de muestra con la mayor precisión posible. Conecte el vacío y filtre la muestra. Si el volumen es menor a 100 ml se agita suavemente el portafiltros mientras se filtra. Lave las paredes del embudo con una solución tamponada estéril, deje filtrar esta solución.

9.4. Adición del medio de cultivo.

Una vez que ha pasado toda la muestra de agua, se desconecta el vacío y abra la ampolla de 2 ml del medio y vierta sobre el pad absorbente distribuyendo por toda la superficie. Se desprende la parte inferior del embudo que es la caja petri, se la tapa y marca adecuadamente para su posterior identificación. El medio de cultivo a emplear es el m-COLIBLUE BROTH.

9.5. Incubación.

Invierta la caja petri (para evitar que el vapor condensado caiga sobre la superficie de la membrana) e incube durante el tiempo y la temperatura adecuada de 24 +/- 4 horas a 35 +/- 0.5 ºC.

9.6. Conteo de colonias.

Extraiga la caja petri de la incubadora y cuente las colonias típicas que presente el aspecto característico de *Escherichia coli,* son colonias positivas las colonias que presenten color azul.

9.7. Verificación de colonias.

Se debe verificar las colonias positivas presuntivas de *E. coli.*

Se verifican las colonias atípicas azules y azules con tono verde. Para agua potable verificar por lo menos 5 colonias sospechosas y 5 colonias típicas que hayan crecido en la membrana. Para muestras de agua natural o residual, verificar por lo menos una vez al mes 10 colonias sospechosas.

9.8. Cálculo de la densidad celular.

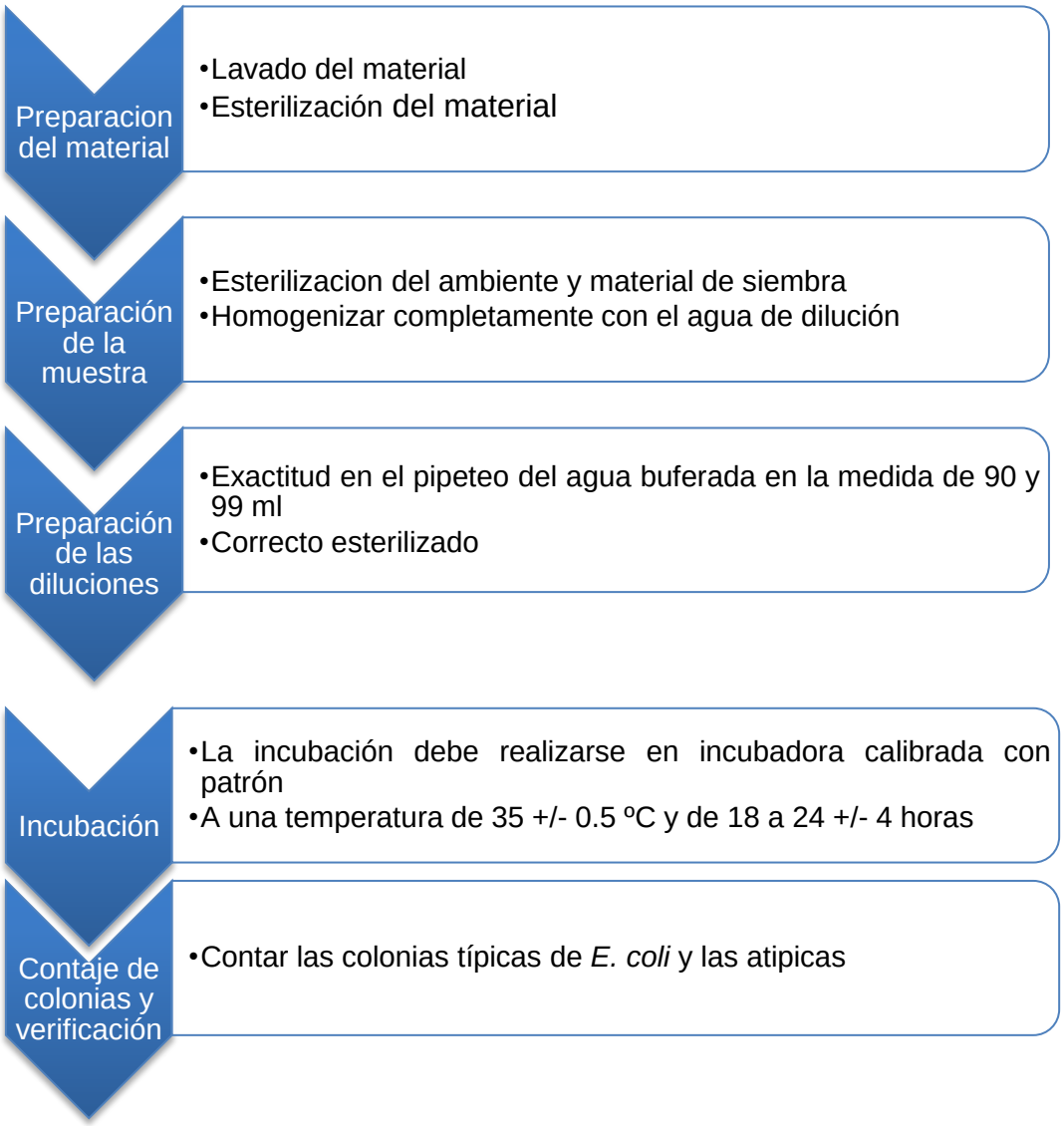
Se expresa los resultados en número de *E. coli* por cada 100 ml de muestra original. En el caso en que no se haya filtrado los 100 ml de muestra, multiplique el recuento obtenido por 100 y dividido para el número de mililitros de muestra que filtró.

$$Colonias/100 = \frac{colonias\ de\ \mathrm{E.coli}\ contadas\ x\ 100}{\mathrm{ml\ de\ muestra\ filtrada}}$$

9.9. Interpretación y resultados.

Exprese los resultados en número de *Escherichia coli* por cada 100 ml de muestra original. En el caso en que no se haya filtrado los 100 ml de muestra multiplique el recuento obtenido por 100 y dividido para el número de mililitros de muestra que filtró.

9.10. Diagrama de puntos críticos.



9.11. Imágenes de referencia.

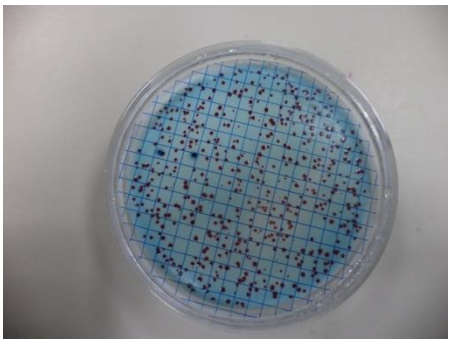


Imagen 14: Caja petri con colonias típicas de *Escherichia coli*
Fuente: La Autora

10. Eliminación de residuos

Los residuos se eliminan en la autoclave de 15 minutos a 15 psi, poniendo la cinta de esterilización para comprobar la temperatura y presión. Una vez destruidos se los puede desechar en la basura común.

11. Fórmula de cálculo

Para realizar el recuento de *Escherichia coli* se utiliza la siguiente fórmula:

$$\boxed{Recuento\ de\ \mathrm{E.coli} = N.de\ colonias\ contadas * inverso\ de\ la\ dilución}$$

12. Autocontrol y aseguramiento de la calidad

El autocontrol y aseguramiento de la calidad se realiza con recuperación, utilizando una suspensión de la bacteria *E. coli* (ATCC 25922). El criterio de aceptación es que la recuperación debe estar del 80 – 110 %.

13. Criterios de aceptación y rechazo

- Los criterios de aceptación y rechazo para los duplicados es de ± 5 %
- Los blancos de medios de cultivo, aguas de dilución deben ser igual a cero, de lo contrario repetir el ensayo

14. Expresión de los resultados

Los resultados se expresan en UFC/100 ml de agua

15. Bibliografía

Standar Methods for the Examination of Water and Wastewater. Method 9215 B. Membrane Filter Technique for *Escherichia coli* method 2012, Edition 22.

DETERMINACIÓN DE PSEUDOMONA AERUGINOSA

1. Objeto

El presente procedimiento tiene por objeto describir las actividades que se realizan para la determinación cuantitativa de *Pseudomona aeruginosa* en aguas.

2. Alcance

Este procedimiento es aplicable para agua de tipo natural, potable y residual; para la determinación de pseudomonas mediante la técnica de filtración por membrana.

3. Descripción del tipo de Item

Las muestras de agua.

4. Principio

Pseudomona aeruginosa es un bacilo aerobio gram-negativo de rápido crecimiento, usado en medios para probar susceptibilidad antimicrobiana, en la evaluación con agar Mueller Hinton. Es un microorganismo oportunista que puede multiplicarse en aguas naturales, marinas y recreativas. Está asociado a patologías dérmicas.

5. Fundamento

El método de filtración por membrana para P. aeruginosa, se basa en hacer pasar la muestra de agua problema a través de un filtro de membrana microporosa, en cuya superficie quedan retenidos los microorganismos. Bastará incubar la membrana sobre un medio de cultivo CETRIMIDE, a la temperatura de 35 a 37 ºC y durante el tiempo de 24 a 36 horas, para posteriormente contar las colonias directamente de la superficie de la membrana.

6. Condiciones ambientales

Temperatura: 18 – 24 ºC

Humedad Relativa: 45 – 65 %

7. Medidas de seguridad

- Ingresar al laboratorio con mandil limpio y desinfectarse los zapatos.
- Trabajar con guantes desinfectados, gorro y mascarilla.
- Incinerar, agujas, azas de platino después de haber terminado el trabajo.

- No ingresar con alimentos.
- Las pipetas que han sido utilizadas después de la siembra se las debe sumergir en agua con cloro.
- Tener mucha precaución al trabajar con las cepas de microorganismos, siempre manipularlas dentro de la cámara de seguridad.
- Mantener la puerta del laboratorio cerrada.

8. Equipos, materiales y reactivos

8.1. Equipos.

- Equipo de porta filtro de acero inoxidable de 3 tomas
- Colector de filtración de tres puestos de acero inoxidable
- Dos matraces (500 y 1000 ml)
- Dos tubos de vacío
- Filtros con soporte y pinza
- Bomba de vacío
- Incubadora
- Contador de colonias
- Cámara de seguridad Biológica 2B2
- Incinerador de azas

8.2. Materiales.

- Pipetas de 10, 5, 2, 1 ml
- Pinzas
- Botellas de dilución
- Embudos de filtración esteriles con su respectiva membrana, caja petri y filtro

8.3. Reactivos, patrones de referencia y material de referencia.

- Medio de cultivo certificado CETRIMIDE
- KH_2PO_4 en grado reactivo
- Cepa de referencia *Pseudomona aeruginosa* certificada: ATCC 25922
- Agua esteril
- Solucion Stock: Agua buferada preparada con KH_2PO_4

Preparación: Se disuelve 34,0 g de KH_2PO_4 en 500 ml de agua, se ajusta el pH a 7,2 con aproximadamente 1,75 ml de NaOH 1M, y diluir a 1 L. Mantener en refrigeración. Diluyente: Diluir 1,25 ml de la solución stock a 1 L con agua. Prepare blancos de dilución con esta solución. Autoclavar 15 minutos a 121 ºC.

9. Descripción del procedimiento

Para iniciar el procedimiento se debe realizar una desinfección del área de trabajo y colocar todo en orden con sus respectivas identificaciones.

9.1. Manipulación de los items de ensayo.

Mantener los medios de cultivo a menos 8 ºC, usarlas antes de la fecha de caducidad impresa en la bolsa. Para cerrar las bolsas, doblar los extremos y verificar que estén bien cerradas. Mantener las bolsas cerradas de nuevo a menos 21 ºC a 50 % de HR (humedad relativa). Usar los medios de cultivo verificando que la tapa esté sellada. Luego de usar los medios de cultivo destruirlos a 121 ºC por 15 minutos.

9.2. Selección del tamaño de la muestra.

El tamaño de la muestra está representado por la densidad bacteriana esperada. Analizando agua de bebida el tamaño de la muestra será limitado por el grado de turbiedad o por el crecimiento de pseudomonas en el medio. Para los propósitos de la regulación 100 ml es el tamaño de la muestra oficial. Un volumen de la muestra ideal rendirá de 20 a 80 colonias de *Pseudomona aeruginosa* y no más de 200 colonias de cualquier tipo en una superficie de filtración por membrana. Analizar filtrando agua de bebida de 100 a 1000 ml o filtrando volúmenes pequeños de muestra como duplicado de 50 a 1000 ml o filtrando volúmenes más pequeños de muestra como duplicado de 50 ml o 4 porciones de 25 ml. Analice filtrando otras aguas en volúmenes diferentes (diluidos o puros) dependiendo de la densidad bacteriana esperada.

9.3. Filtración de la muestra.

El proceso inicia armando el equipo de filtración: cada manifold con su respectivo kit de filtración, para esto se utiliza embudos de filtración con su propia membrana y filtro con lo que se reduce el contacto y contaminación de la muestra; se agita la muestra en su propio recipiente y añada al embudo. Siempre se debe verter un volumen conocido de muestra con la mayor precisión posible. Conecte el vacío y filtre la muestra. Si el volumen es menor a 100 ml se agita suavemente el portafiltros mientras se filtra. Lave las paredes del embudo con una solución tamponada estéril, deje filtrar esta solución.

9.4. Adición del medio de cultivo.

Una vez que ha pasado toda la muestra de agua, se desconecta el vacío y abra la ampolla de 2 ml del medio y vierta sobre el pad absorbente distribuyendo por toda la superficie. Se desprende la parte inferior del embudo que es la caja petri, se la tapa y marca adecuadamente para su posterior identificación. El medio de cultivo a emplear es el CETRIMIDE.

9.5. Incubación.

Invierta la caja petri (para evitar que el vapor condensado caiga sobre la superficie de la membrana) e incube durante el tiempo y la temperatura adecuada de 24 a 36 horas a 35 a 37 ºC.

9.6. Conteo de colonias.

Extraiga la caja petri de la incubadora y cuente las colonias típicas que presente el aspecto característico de *Pseudomona aeruginosa*, son colonias positivas las que presenten color de verde a azul con fluorescencia a la luz ultravioleta

9.7. Verificación de colonias.

Se verifican las colonias atípicas con fluorescencia en cintas de oxidasa, si da negro es positivo para *Pseudomona aeruginosa.* Para agua potable verificar por lo menos 5 colonias sospechosas y 5 colonias típicas que hayan crecido en la membrana. Para muestras de agua natural o residual, verificar por lo menos una vez al mes 10 colonias sospechosas.

9.8. Cálculo de la densidad celular.

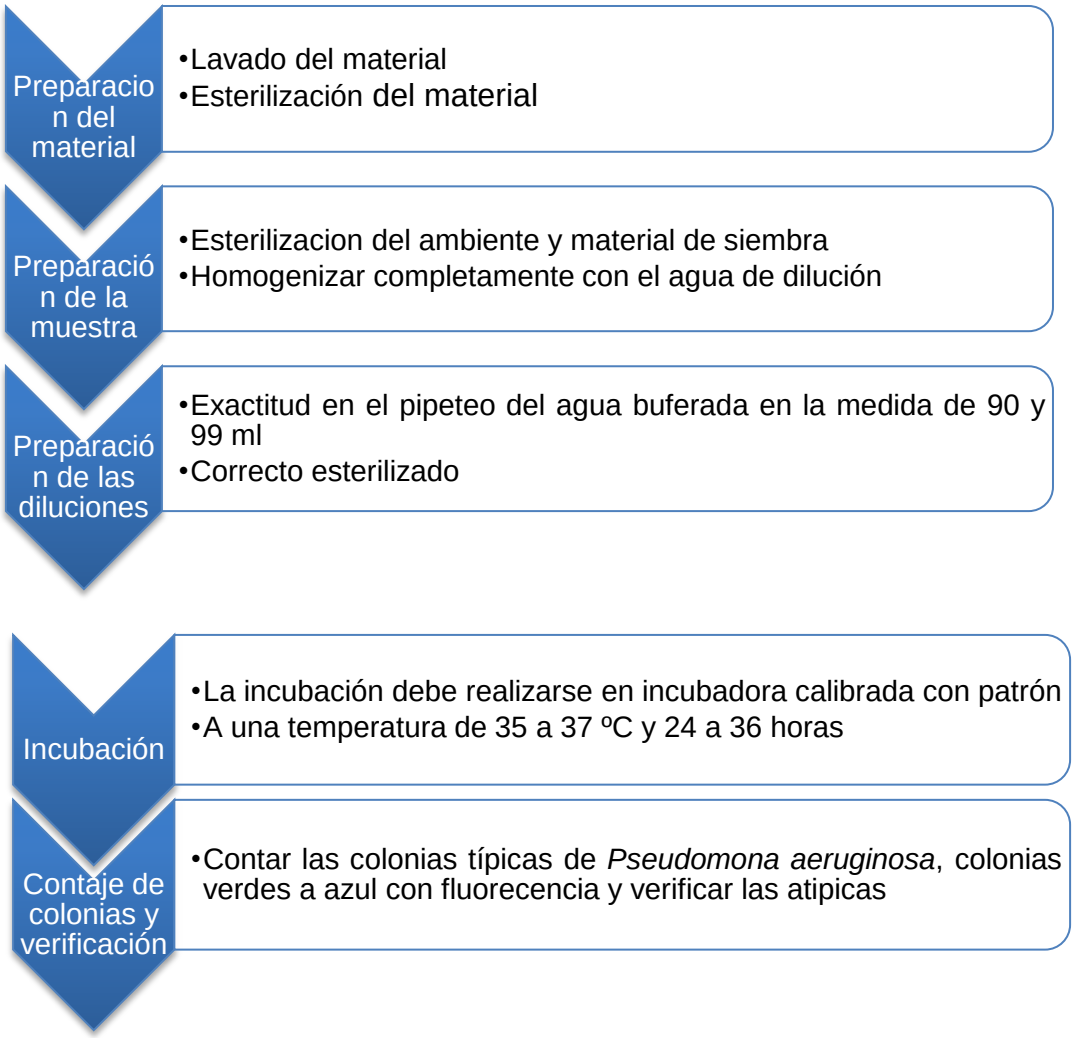
Se expresa los resultados en número de pseudomonas por cada 100 ml de muestra original. En el caso en que no se haya filtrado los 100 ml de muestra, multiplique el recuento obtenido por 100 y dividido para el número de mililitros de muestra que filtró.

$$Colonias\ por/100 = \frac{colonias\ de\ pseudomonas\ x\ 100}{\text{ml de muestra filtrada}}$$

9.9. Interpretación y resultados.

Exprese los resultados en número de *Pseudomona aeruginosa* por cada 100 ml de muestra original. En el caso en que no se haya filtrado los 100 ml de muestra multiplique el recuento obtenido por 100 y dividido para el número de mililitros de muestra que filtró.

9.10. Diagrama de puntos críticos.



9.11. Imágenes de referencia.

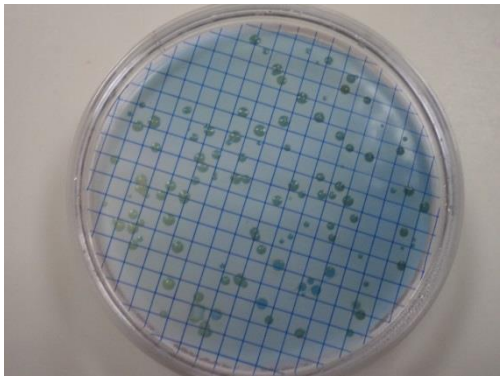


Imagen 15: Caja petri con colonias típicas de *Pseudomona aeruginosa*
Fuente: La Autora

Confirmación:

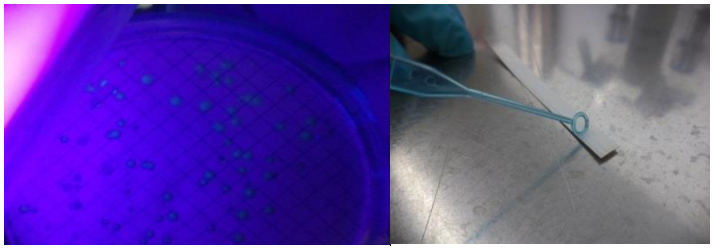


Imagen16: Confirmación de colonias de *Pseudomona aeruginosa* (De Izq. a derecha) Fluorecencia a la luz UV y positivo a cintas de oxidasa.
Fuente: La Autora

10. Eliminación de residuos

Los residuos se eliminan en la autoclave de 15 minutos a 15 psi, poniendo la cinta de esterilización para comprobar la temperatura y presión. Una vez destruidos se los puede desechar en la basura común.

11. Fórmula de cálculo

Para realizar el recuento de *Pseudomona aeruginosa* se utiliza la siguiente fórmula:

$$\boxed{Recuento\ de\ pseudomonas = N.de\ colonias\ contadas * inverso\ de\ la\ dilución}$$

12. Autocontrol y aseguramiento de la calidad

El autocontrol y aseguramiento de la calidad se realiza con recuperación, utilizando una suspensión de la bacteria *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 25922). El criterio de aceptación es que la recuperación debe estar del 80 – 110 %.

13. Criterios de aceptación y rechazo

- Los criterios de aceptación y rechazo para los duplicados es de ± 5 %
- Los blancos de medios de cultivo, aguas de dilución deben ser igual a cero, de lo contrario repetir el ensayo

14. Expresión de los resultados

Los resultados se expresan en UFC/100 ml de agua

15. Bibliografía

Standar Methods for the Examination of Water and Wastewater. Method 9213 E. Membrane Filter Technique for *Pseudomonas aeruginosa* method 2012, Edition 22.

CAPÍTULO IV
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Determinación de los niveles de trabajo

❖ Resultados de colonias en suspensiones bacterianas (A).

A continuación se presentan los resultados de la siembra de las suspensiones bacterianas en cada nivel de *Escherichia coli* (tabla 5) y *Pseudomona aeruginosa* (tabla 6).

Tabla 5: Resultados de suspensiones de trabajo para la cepa de *E. coli*

Escherichia coli	
Nivel	Resultado (UFC)
A	43
B	29
C	13
D	5

Fuente: La Autora

Tabla 6: Resultados de suspensiones de trabajo para la cepa de *Pseudomona A.*

Pseudomona aeruginosa	
Nivel	Resultado (UFC)
A	58
B	34
C	19
D	7

Fuente: La Autora

Discusión:

Como se observa en las tablas 5 y 6 los niveles de trabajo que se eligió son bajos, esto se hizo tomando en cuenta que se iba a validar los métodos en las propias matrices de agua potable, natural y residual, y se debía realizar diluciones, entonces resulta mejor trabajar con concentraciones bajas, de esta manera el crecimiento y conteo es favorable.

❖ Conteo de microorganismos en las matrices seleccionadas (B).

A continuación en la tabla 7 se muestran los resultados de los diferentes parámetros de contaminación microbiana obtenidos por contaje en placas de las matrices de agua

seleccionadas. (Para muestras de agua natural se trabajó con una *Dilución a la -2 y para muestras de agua residual **Dilución a la -6).

Tabla 7: Resultados de ensayos en las matrices de trabajo seleccionadas.

MICROORGANISMO / MATRIZ	ESCHERICHIA COLI UFC/100ml	COLIFORMES TOTALES UFC/100ml	COLIFORMES FECALES UFC/100ml	PSEUDOMONA AERUGINOSA UFC/100ml	pH
AGUA POTABLE	0	0	0	0	6,13
*AGUA NATURAL	3	9	1	0	6,79
**AGUA RESIDUAL	4	17	6	0	8,15

Fuente: La Autora

Discusión:

En la tabla anterior se muestran los resultados que se obtuvieron al analizar cada matriz de agua antes de inocularla con los niveles de trabajo. En las muestras de agua potable filtradas directamente, no se encontró presencia de microorganismos.

En las muestras de agua natural, se hizo filtraciones en diluciones a la -2 y se encontró 900 UFC/100 ml de coliformes totales, 300 UFC/100 ml de *Escherichia coli* y 100 UFC/100 ml de Coliformes fecales. En las muestras de agua residual filtradas en dilución a la -6 se encontró 17000000 UFC/100 ml de coliformes totales, 4000000 UFC/100 ml de escherichia coli y 6000000 UFC/100 ml de coliformes fecales. No se encontró contaminación inicial por *Pseudomona aeruginosa* en ninguna de las tres matrices.

- **Niveles de trabajo (A+B).**

Los niveles de trabajo como se mencionó anteriormente son 4 (A, B, C, D), a continuación se presentan los valores en UFC para cada nivel, estos se determinaron sumando los resultados de las suspensiones bacterianas (tablas 5 y 6) más los resultados de cada matriz de ensayo (tabla 7).

Tabla 8: Niveles de trabajo para coliformes fecales.

Coliformes fecales			
Matriz / **Nivel**	Agua Potable	Agua Natural	Agua Residual
A	43	44	49

B	29	30	35
C	13	14	19
D	5	6	11

Fuente: La Autora

Tabla 9: Niveles de trabajo para coliformes totales.

Coliformes totales

Matriz / Nivel	Agua Potable	Agua Natural	Agua Residual
A	43	52	60
B	29	38	46
C	13	22	30
D	5	14	22

Fuente: La Autora

Tabla 10: Niveles de trabajo para *Escherichia coli.*

Escherichia coli

Matriz / Nivel	Agua Potable	Agua Natural	Agua Residual
A	43	46	47
B	29	32	33
C	13	16	17
D	5	8	9

Fuente: La Autora

Tabla 11: Niveles de trabajo para *Pseudomona aeruginosa.*

Pseudomona aeruginosa

Matriz / Nivel	Agua Potable	Agua Natural	Agua Residual
A	58	58	58
B	34	34	34
C	19	19	19
D	7	7	7

Fuente: La Autora

Discusión:

En las tablas anteriores se muestran las concentraciones reales que se filtró y luego se reportan la recuperación que se obtuvo de estas. Como se observa en las tablas 8, 9 y 10 se

repiten los resultados para la matriz de agua potable, esto es debido a que no se encontró presencia de estos microorganismos, al igual que en la tabla 11 se repiten los resultados en las matrices, porque en ninguna de se encontró presencia de *Pseudomona aeruginosa.*

4.2. Resultados de los ensayos de filtración por membrana

En las siguientes tablas se muestran los resultados que se obtuvieron en los ensayos de filtración por membrana durante los tres días de validación.

- ✓ **Coliformes Fecales.**

Luego de haber inoculado las muestras con los niveles de coliformes fecales preparados, se realizó los ensayos de filtración a través de membrana. En las siguientes tablas se muestra los resultados obtenidos durante los tres dias

Tabla 12: Resultados de coliformes fecales en muestras de agua potable.

Agua Potable								
Nivel Referencia		Nº de repetición	Día 1		Día 2		Día3	
UFC	Log10		UFC/100ml	Log	UFC/100ml	Log	UFC/100ml	Log
A 43	1,63	1	42	1,62	41	1,61	40	1,60
		2	40	1,60	42	1,62	40	1,60
		3	43	1,63	40	1,60	41	1,61
		4	42	1,62	42	1,62	39	1,59
		5	42	1,62	41	1,61	41	1,61
B 29	1,46	1	29	1,46	28	1,45	27	1,43
		2	28	1,45	27	1,43	29	1,46
		3	26	1,41	29	1,46	28	1,45
		4	28	1,45	28	1,45	28	1,45
		5	28	1,45	25	1,40	27	1,43
C 13	1,11	1	13	1,11	13	1,11	12	1,08
		2	10	1,00	12	1,08	12	1,08
		3	12	1,08	11	1,04	11	1,04
		4	10	1,00	12	1,08	13	1,11
		5	12	1,08	11	1,04	11	1,04
D 5	0,70	1	4	0,60	5	0,70	4	0,60
		2	4	0,60	4	0,60	5	0,70
		3	5	0,70	4	0,60	5	0,70
		4	4	0,60	4	0,60	4	0,60
		5	4	0,60	5	0,70	4	0,60

Fuente: La Autora

Tabla 13: Resultados de coliformes fecales en muestras de agua natural.

Fuente: La Autora

Agua Natural								
Nivel Referencia		Nº de repetición	Día 1		Día 2		Día3	
UFC	Log10		UFC/100ml	Log	UFC/100ml	Log	UFC/100ml	Log
A 44	1,64	1	43	1,63	42	1,62	41	1,61
		2	42	1,62	43	1,63	44	1,64
		3	40	1,60	42	1,62	42	1,62
		4	42	1,62	42	1,62	41	1,61
		5	42	1,62	41	1,61	42	1,62
B 30	1,48	1	29	1,46	27	1,43	28	1,45
		2	28	1,45	29	1,46	28	1,45
		3	28	1,45	28	1,45	27	1,43
		4	28	1,45	29	1,46	28	1,45
		5	30	1,48	28	1,45	28	1,45
C 14	1,15	1	11	1,04	12	1,08	13	1,11
		2	12	1,08	13	1,11	13	1,11
		3	12	1,08	12	1,08	12	1,08
		4	13	1,11	12	1,08	12	1,08
		5	12	1,08	14	1,15	13	1,11
D 6	0,78	1	5	0,70	6	0,78	5	0,70
		2	6	0,78	5	0,70	5	0,70
		3	5	0,70	4	0,60	4	0,60
		4	4	0,60	5	0,70	4	0,60
		5	5	0,70	5	0,70	5	0,70

Tabla 14: Resultados de coliformes fecales en muestras de agua residual.

Agua Residual								
Nivel Referencia		Nº de repetición	Día 1		Día 2		Día3	
UFC	Log10		UFC/100ml	Log	UFC/100ml	Log	UFC/100ml	Log
A 49	1,69	1	48	1,68	49	1,69	48	1,68
		2	42	1,62	47	1,67	47	1,67
		3	49	1,69	48	1,68	47	1,67
		4	47	1,67	47	1,67	48	1,68
		5	46	1,66	47	1,67	47	1,67
B 35	1,54	1	33	1,52	32	1,51	35	1,54
		2	35	1,54	34	1,53	30	1,48
		3	34	1,53	33	1,52	33	1,52
		4	33	1,52	33	1,52	34	1,53
		5	34	1,53	34	1,53	32	1,51
C 19	1,28	1	15	1,18	18	1,26	17	1,23
		2	17	1,23	19	1,28	16	1,20
		3	18	1,26	17	1,23	17	1,23
		4	16	1,20	16	1,20	17	1,23
		5	17	1,23	17	1,23	18	1,26
D 11	1,04	1	10	1,00	11	1,04	8	0,90
		2	9	0,95	10	1,00	9	0,95
		3	10	1,00	10	1,00	9	0,95
		4	8	0,90	9	0,95	11	1,04
		5	9	0,95	8	0,90	10	1,00

Fuente: La Autora

Discusión:

Como se observa en las tablas anteriores, se obtuvieron resultados por debajo del valor objetivo en la mayoría de ensayos y solo en algunos el valor resultado es igual al objetivo.

En las matrices de agua residual es en la que se dió un mejor crecimiento de coliformes fecales, aunque para el nivel más bajo de esta y de todas las matrices, se observa que el valor resultado no está cerca del valor objetivo.

- ✓ **Coliformes totales.**

Luego de haber inoculado las muestras de las matrices de agua con los niveles de coliformes totales preparados, se realizó los ensayos de filtración a través de membrana. En las siguientes tablas se muestra los resultados obtenidos durante los tres dias.

Tabla 15: Resultados de coliformes totales en muestras de agua potable.

Agua Potable								
Nivel Referencia		Nº de repetición	Día 1		Día 2		Día3	
UFC	Log10		UFC/100ml	Log	UFC/100ml	Log	UFC/100ml	Log
A 43	1,63	1	41	1,61	41	1,61	42	1,62
		2	43	1,63	42	1,62	41	1,61
		3	42	1,62	42	1,62	42	1,62
		4	40	1,60	40	1,60	40	1,60
		5	41	1,61	41	1,61	40	1,60
B 29	1,46	1	29	1,46	28	1,45	26	1,41
		2	27	1,43	24	1,38	26	1,41
		3	28	1,45	27	1,43	27	1,43
		4	28	1,45	28	1,45	26	1,41
		5	27	1,43	27	1,43	25	1,40
C 13	1,11	1	12	1,08	13	1,11	12	1,08
		2	12	1,08	12	1,08	13	1,11
		3	11	1,04	12	1,08	13	1,11
		4	13	1,11	12	1,08	10	1,00
		5	11	1,04	11	1,04	12	1,08
D 5	0,70	1	4	0,60	4	0,60	5	0,70
		2	5	0,70	4	0,60	4	0,60
		3	4	0,60	4	0,60	4	0,60
		4	4	0,60	4	0,60	4	0,60
		5	4	0,60	5	0,70	4	0,60

Fuente: La Autora

Tabla 16: Resultados de coliformes totales en muestras de agua natural.

Agua Natural								
Nivel Referencia		Nº de repetición	Día 1		Día 2		Día3	
UFC	Log10		UFC/100ml	Log	UFC/100ml	Log	UFC/100ml	Log
A 52	1,72	1	50	1,70	48	1,68	51	1,71
		2	49	1,69	50	1,70	51	1,71
		3	52	1,72	48	1,68	43	1,63
		4	51	1,71	48	1,68	50	1,70
		5	50	1,70	49	1,69	51	1,71
B 38	1,58	1	37	1,57	37	1,57	36	1,56
		2	36	1,56	37	1,57	36	1,56
		3	36	1,56	36	1,56	31	1,49
		4	37	1,57	33	1,52	37	1,57
		5	35	1,54	35	1,54	36	1,56
C 22	1,34	1	21	1,32	20	1,30	19	1,28
		2	21	1,32	18	1,26	20	1,30
		3	20	1,30	20	1,30	22	1,34
		4	18	1,26	21	1,32	20	1,30
		5	22	1,34	21	1,32	19	1,28
D 14	1,15	1	13	1,11	11	1,04	13	1,11
		2	13	1,11	12	1,08	14	1,15
		3	12	1,08	12	1,08	12	1,08
		4	14	1,15	13	1,11	9	0,95
		5	12	1,08	11	1,04	13	1,11

Fuente: La Autora

Tabla 17: Resultados de coliformes totales en muestras de agua residual.

Agua Residual								
Nivel Referencia		Nº de repetición	Día 1		Día 2		Día3	
UFC	Log10		UFC/100ml	Log	UFC/100ml	Log	UFC/100ml	Log
A 60	1,78	1	59	1,77	56	1,75	57	1,76
		2	57	1,76	57	1,76	56	1,75
		3	61	1,79	55	1,74	57	1,76
		4	58	1,76	56	1,75	58	1,76
		5	58	1,76	56	1,75	59	1,77
B 46	1,66	1	43	1,63	44	1,64	44	1,64
		2	45	1,65	45	1,65	42	1,62
		3	45	1,65	40	1,60	42	1,62
		4	44	1,64	42	1,62	43	1,63
		5	42	1,62	43	1,63	46	1,66
C 30	1,48	1	29	1,46	26	1,41	23	1,36
		2	30	1,48	26	1,41	26	1,41
		3	28	1,45	27	1,43	28	1,45
		4	27	1,43	28	1,45	29	1,46
		5	27	1,43	26	1,41	28	1,45
D 22	1,34	1	21	1,32	19	1,28	17	1,23
		2	20	1,30	17	1,23	19	1,28
		3	20	1,30	21	1,32	18	1,26
		4	21	1,32	19	1,28	25	1,40
		5	19	1,28	16	1,20	20	1,30

Fuente: La Autora

Discusión:

Como se observa en las tablas anteriores, se obtuvieron resultados por debajo del valor objetivo en la mayoría de ensayos y solo en algunos el valor resultado es igual al objetivo.

En las matrices de agua residual es en la que se dió un mejor crecimiento de coliformes totales, aunque para el nivel más bajo de esta y de todas las matrices, se observa que el valor resultado no está cerca del valor objetivo.

- ✓ ***Escherichia coli.***

Luego de haber inoculado las muestras de las matrices de agua con los niveles de *Escherichia coli* preparados, se realizó los ensayos de filtración a través de membrana. En las siguientes tablas se muestra los resultados obtenidos durante los tres dias.

Tabla 18: Resultados de *Escherichia coli* en muestras de agua potable.

Agua Potable								
Nivel Referencia		Nº de repetición	Día 1		Día 2		Día3	
UFC	**Log10**		UFC/100ml	Log	UFC/100ml	Log	UFC/100ml	Log
A 43	**1,63**	1	42	1,62	41	1,61	42	1,62
		2	41	1,61	42	1,62	41	1,61
		3	43	1,63	41	1,61	42	1,62
		4	42	1,62	42	1,62	40	1,60
		5	40	1,60	38	1,58	39	1,59
B 29	**1,46**	1	27	1,43	28	1,45	27	1,43
		2	28	1,45	26	1,41	27	1,43
		3	27	1,43	26	1,41	25	1,40
		4	26	1,41	29	1,46	27	1,43
		5	29	1,46	27	1,43	26	1,41
C 13	**1,11**	1	11	1,04	12	1,08	12	1,08
		2	11	1,04	10	1,00	10	1,00
		3	13	1,11	12	1,08	11	1,04
		4	10	1,00	11	1,04	13	1,11
		5	12	1,08	12	1,08	12	1,08
D 5	**0,70**	1	5	0,70	4	0,60	4	0,60
		2	4	0,60	5	0,70	4	0,60
		3	4	0,60	4	0,60	5	0,70
		4	4	0,60	5	0,70	4	0,60
		5	4	0,60	4	0,60	4	0,60

Fuente: La Autora

Tabla 19: Resultados de *Escherichia coli* en muestras de agua natural.

Agua Natural								
Nivel Referencia		Nº de repetición	Día 1		Día 2		Día3	
UFC	Log10		UFC/100ml	Log	UFC/100ml	Log	UFC/100ml	Log
A 46	1,66	1	43	1,63	42	1,62	46	1,66
		2	45	1,65	43	1,63	42	1,62
		3	47	1,67	42	1,62	42	1,62
		4	42	1,62	43	1,63	44	1,64
		5	43	1,63	45	1,65	43	1,63
B 32	1,51	1	30	1,48	31	1,49	28	1,45
		2	32	1,51	30	1,48	31	1,49
		3	29	1,46	29	1,46	29	1,46
		4	31	1,49	29	1,46	28	1,45
		5	29	1,46	28	1,45	27	1,43
C 16	1,20	1	14	1,15	13	1,11	14	1,15
		2	15	1,18	13	1,11	13	1,11
		3	14	1,15	16	1,20	15	1,18
		4	15	1,18	12	1,08	12	1,08
		5	13	1,11	15	1,18	14	1,15
D 8	0,90	1	7	0,85	6	0,78	6	0,78
		2	5	0,70	7	0,85	7	0,85
		3	6	0,78	6	0,78	6	0,78
		4	6	0,78	5	0,70	5	0,70
		5	7	0,85	8	0,90	7	0,85

Fuente: La Autora

Tabla 20: Resultados de *Escherichia coli* en muestras de agua residual.

Agua Residual								
Nivel Referencia		Nº de repetición	Día 1		Día 2		Día3	
UFC	Log10		UFC/100ml	Log	UFC/100ml	Log	UFC/100ml	Log
A 47	1,67	1	44	1,64	45	1,65	45	1,65
		2	46	1,66	47	1,67	45	1,65
		3	45	1,65	45	1,65	42	1,62
		4	44	1,64	46	1,66	42	1,62
		5	46	1,66	44	1,64	46	1,66
B 33	1,52	1	32	1,51	32	1,51	30	1,48
		2	30	1,48	32	1,51	33	1,52
		3	31	1,49	30	1,48	32	1,51
		4	33	1,52	33	1,52	32	1,51
		5	31	1,49	29	1,46	31	1,49
C 17	1,23	1	15	1,18	14	1,15	16	1,20
		2	16	1,20	15	1,18	15	1,18
		3	16	1,20	16	1,20	14	1,15
		4	14	1,15	15	1,18	17	1,23
		5	15	1,18	16	1,20	14	1,15
D 9	0,95	1	8	0,90	9	0,95	7	0,85
		2	7	0,85	6	0,78	7	0,85
		3	6	0,78	8	0,90	6	0,78
		4	9	0,95	6	0,78	6	0,78
		5	6	0,78	8	0,90	9	0,95

Fuente: La Autora

Discusión:

Como se observa en las tablas anteriores, se obtuvieron resultados por debajo del valor objetivo en la mayoría de ensayos y solo en algunos el valor resultado es igual al objetivo.

En las matrices de agua residual es en la que se dió un mejor crecimiento de *Escherichia coli*, aunque para el nivel más bajo de esta y de todas las matrices, se observa que el valor resultado no está cerca del valor objetivo.

- ✓ **Pseudomona Aeruginosa.**

Luego de haber inoculado las muestras de las matrices de agua con los niveles de *Pseudomona aeruginosa* preparados, se realizó los ensayos de filtración a través de membrana. En las siguientes tablas se muestra los resultados obtenidos durante los tres dias.

Tabla 21: Resultados de *Pseudomona aeruginosa* en muestras de agua potable.

Agua Potable								
Nivel Referencia		Nº de repetición	Día 1		Día 2		Día3	
UFC	log10		UFC/100ml	Log	UFC/100ml	Log	UFC/100ml	Log
A 58	1,76	1	56	1,75	55	1,74	57	1,76
		2	55	1,74	56	1,75	56	1,75
		3	55	1,74	54	1,73	57	1,76
		4	52	1,72	56	1,75	54	1,73
		5	56	1,75	53	1,72	56	1,75
B 34	1,53	1	31	1,49	32	1,51	32	1,51
		2	33	1,52	33	1,52	31	1,49
		3	32	1,51	32	1,51	30	1,48
		4	30	1,48	32	1,51	31	1,49
		5	31	1,49	32	1,51	30	1,48
C 19	1,28	1	18	1,26	18	1,26	16	1,20
		2	19	1,28	17	1,23	17	1,23
		3	18	1,26	17	1,23	16	1,20
		4	17	1,23	18	1,26	18	1,26
		5	18	1,26	18	1,26	17	1,23
D 7	0,85	1	7	0,85	6	0,78	5	0,70
		2	5	0,70	7	0,85	6	0,78
		3	6	0,78	5	0,70	5	0,70
		4	5	0,70	5	0,70	6	0,78
		5	6	0,78	6	0,78	7	0,85

Fuente: La Autora

Tabla 22: Resultados de *Pseudomona aeruginosa* en muestras de agua natural.

Agua Natural								
Nivel Referencia		Nº de repetición	Día 1		Día 2		Día3	
UFC	log10		UFC/100ml	Log	UFC/100ml	Log	UFC/100ml	Log
A 58	1,76	1	57	1,76	56	1,75	52	1,72
		2	57	1,76	56	1,75	55	1,74
		3	58	1,76	57	1,76	56	1,75
		4	55	1,74	56	1,75	54	1,73
		5	54	1,73	56	1,75	55	1,74
B 34	1,53	1	32	1,51	32	1,51	32	1,51
		2	31	1,49	33	1,52	30	1,48
		3	33	1,52	30	1,48	31	1,49
		4	32	1,51	33	1,52	33	1,52
		5	33	1,52	34	1,53	33	1,52
C 19	1,28	1	17	1,23	18	1,26	17	1,23
		2	17	1,23	18	1,26	16	1,20
		3	19	1,28	16	1,20	17	1,23
		4	16	1,20	17	1,23	14	1,15
		5	18	1,26	19	1,28	16	1,20
D 7	0,85	1	7	0,85	6	0,78	6	0,78
		2	5	0,70	6	0,78	5	0,70
		3	6	0,78	6	0,78	5	0,70
		4	6	0,78	7	0,85	6	0,78
		5	5	0,70	5	0,70	6	0,78

Fuente: La Autora

Tabla 23: Resultados de *Pseudomona aeruginosa* en muestras de agua residual.

Agua Residual								
Nivel Referencia		Nº de repetición	Día 1		Día 2		Día3	
UFC	log10		UFC/100ml	Log	UFC/100ml	Log	UFC/100ml	Log
A 58	1,76	1	51	1,71	55	1,74	56	1,75
		2	57	1,76	57	1,76	57	1,76
		3	52	1,72	54	1,73	50	1,70
		4	56	1,75	57	1,76	56	1,75
		5	55	1,74	55	1,74	55	1,74
B 34	1,53	1	33	1,52	32	1,51	30	1,48
		2	30	1,48	34	1,53	31	1,49
		3	32	1,51	32	1,51	31	1,49
		4	33	1,52	31	1,49	32	1,51
		5	29	1,46	33	1,52	33	1,52
C 19	1,28	1	18	1,26	16	1,20	18	1,26
		2	18	1,26	16	1,20	17	1,23
		3	17	1,23	18	1,26	18	1,26
		4	19	1,28	17	1,23	17	1,23
		5	16	1,20	15	1,18	17	1,23
D 7	0,85	1	6	0,78	5	0,70	6	0,78
		2	6	0,78	5	0,70	7	0,85
		3	5	0,70	6	0,78	5	0,70
		4	6	0,78	6	0,78	6	0,78
		5	5	0,70	7	0,85	5	0,70

Fuente: La Autora

4.3. Linealidad

Para evaluar la linealidad se trabajó en base a las 4 concentraciones de referencia o niveles de trabajo (A, B, C, D) para cada microorganismo en las matrices de agua potable, natural y residual. A continuación se presentan las gráficas de linealidad para cada uno, en las cuales se grafica los valores (en Log) objetivos (Y) versus la media de los valores experimentales (X). El criterio de aceptación de este parámetro se hará en base al coeficiente de correlación y la pendiente.

- **Coliformes fecales.**

A continuación se exponen los resultados de linealidad para coliformes fecales en las tres matrices de agua seleccionadas.

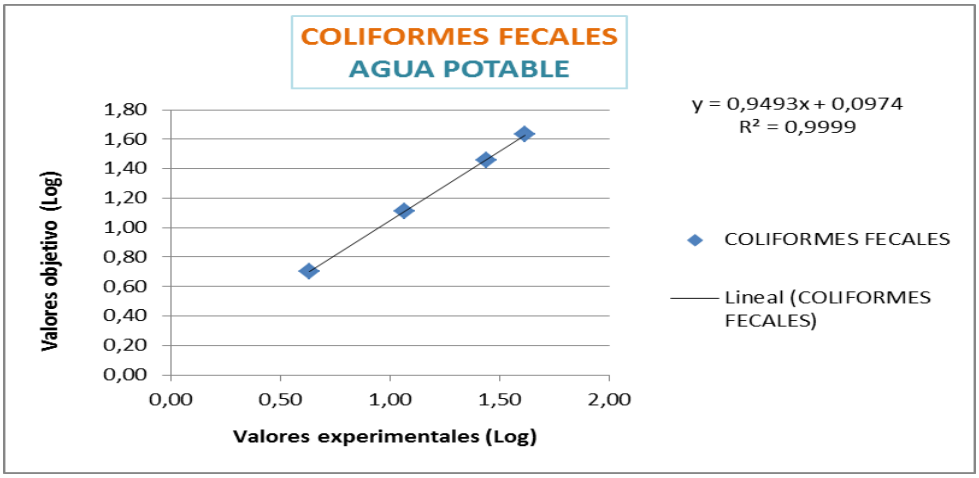
❖ ***Agua Potable.***

Tabla 24: Valores experimentales (Y) y valores objetivo (X) de coliformes fecales en la matriz de agua potable.

Coliformes fecales - Agua potable	
X	Y
1,61	1,63
1,44	1,46
1,07	1,11
0,63	0,70

Fuente: La Autora

Grafica 1: Linealidad de coliformes fecales en la matriz de agua potable.



Fuente: La Autora

Tabla 25: Coeficiente de correlación y pendiente para coliformes fecales en agua potable

Criterio de aceptación	Resultado
Coeficiente de correlación	0,9999
Pendiente	0,9493

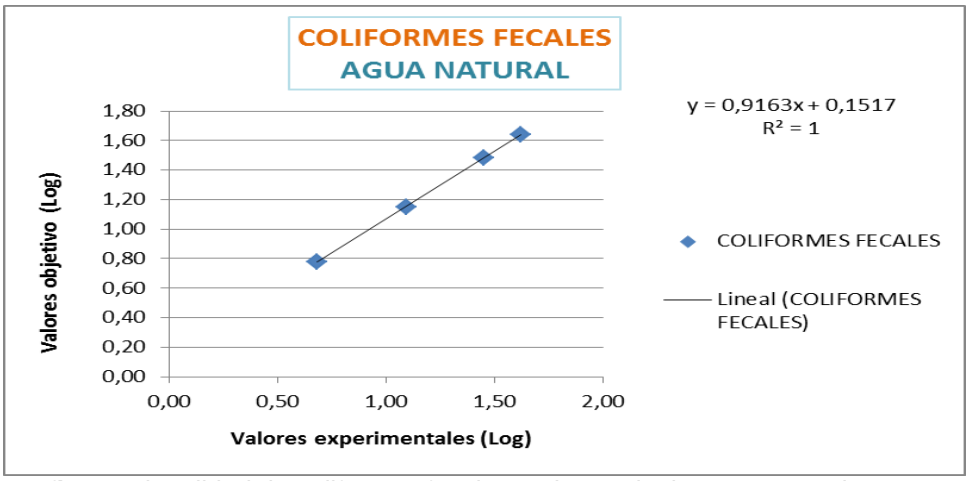
Fuente: La Autora

- ***Agua Natural.***

Tabla 26: Valores experimentales (Y) y valores objetivo (X) de coliformes fecales en la matriz de agua natural

Coliformes fecales - Agua natural	
X	**Y**
1,64	**1,62**
1,48	**1,45**
1,15	**1,09**
0,78	**0,68**

Fuente: La Autora



Grafica 2: Linealidad de coliformes fecales en la matriz de agua natural.

Fuente: La Autora

Tabla 27: Coeficiente de correlación y pendiente para coliformes fecales en agua natural.

Criterio de aceptación	Resultado
Coeficiente de correlación	1
Pendiente	0.9163

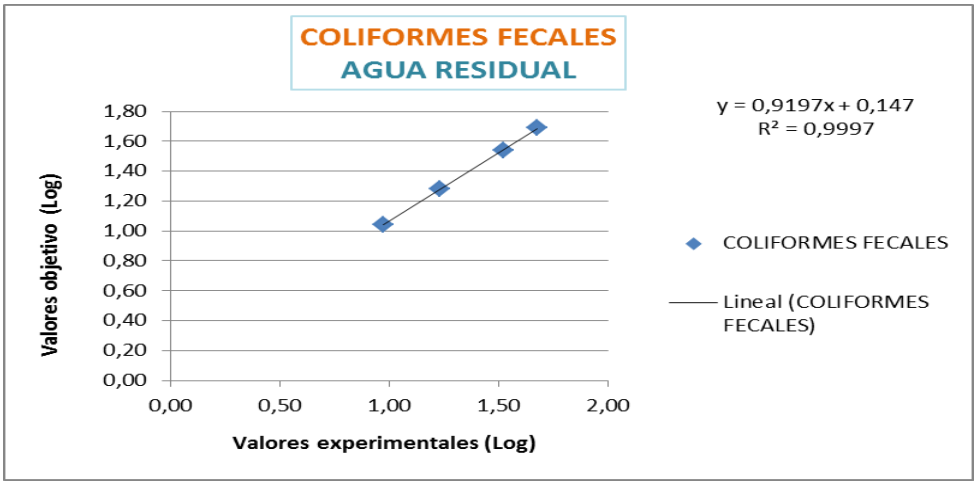
Fuente: La Autora

❖ ***Agua residual.***

Tabla 28: Valores experimentales (Y) y valores objetivo (X) de coliformes fecales en la matriz de agua residual.

COLIFORMES FECALES - AGUA RESIDUAL	
X	**Y**
1,69	**1,67**
1,54	**1,52**
1,28	**1,23**
1,04	**0,97**

Fuente: La Autora



Grafica 3: Linealidad de coliformes fecales en la matriz de agua residual.

Fuente: La Autora

Tabla 29: Coeficiente de correlación y pendiente para coliformes fecales en agua residual.

Criterio de aceptación	Resultado
Coeficiente de correlación	0,9999
Pendiente	0.9197

Fuente: La Autora

- **Coliformes totales.**

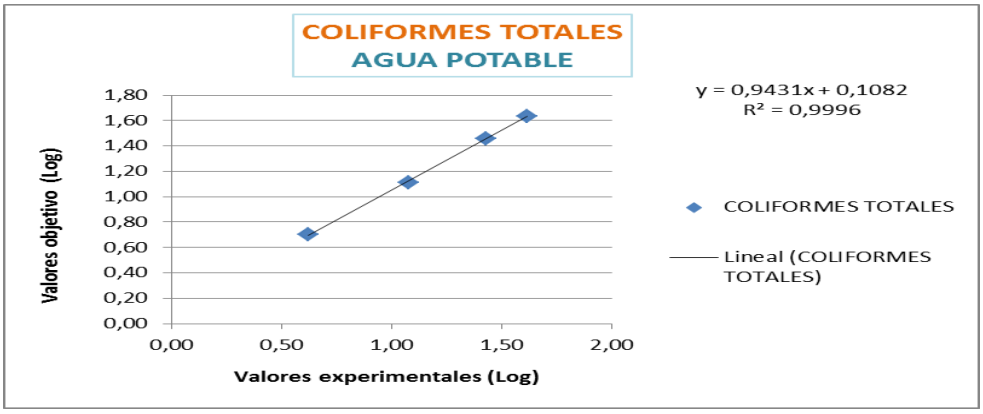
A continuación se exponen los resultados de linealidad para coliformes totales en las tres matrices de agua seleccionadas (Agua potable, natural y residual).

❖ ***Agua potable.***

Tabla 30: Valores experimentales (Y) y valores objetivo (X) de coliformes totales en la matriz de agua potable.

COLIFORMES TOTALES - AGUA POTABLE	
X	**Y**
1,63	**1,61**
1,46	**1,43**
1,11	**1,08**
0,70	**0,62**

Fuente: La Autora



Grafica 4: Linealidad de coliformes totales en la matriz de agua potable.

Fuente: La Autora

Tabla 31: Coeficiente de correlación y pendiente para coliformes totales en agua potable.

Criterio de aceptación	Resultado
Coeficiente de correlación	0,9998
Pendiente	0,9431

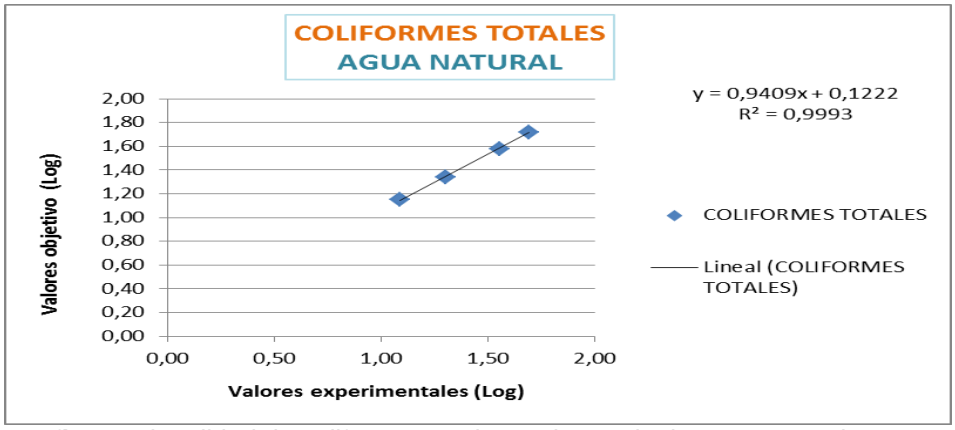
Fuente: La Autora

- ***Agua natural.***

Tabla 32: Valores experimentales (Y) y valores objetivo (X) de coliformes totales en la matriz de agua natural.

COLIFORMES TOTALES - AGUA NATURAL	
X	**Y**
1,72	**1,69**
1,58	**1,55**
1,34	**1,30**
1,15	**1,09**

Fuente: La Autora



Grafica 5: Linealidad de coliformes totales en la matriz de agua natural.

Fuente: La Autora

Tabla 33: Coeficiente de correlación y pendiente para coliformes totales en agua natural.

Criterio de aceptación	Resultado
Coeficiente de correlación	0,9997
Pendiente	0,9409

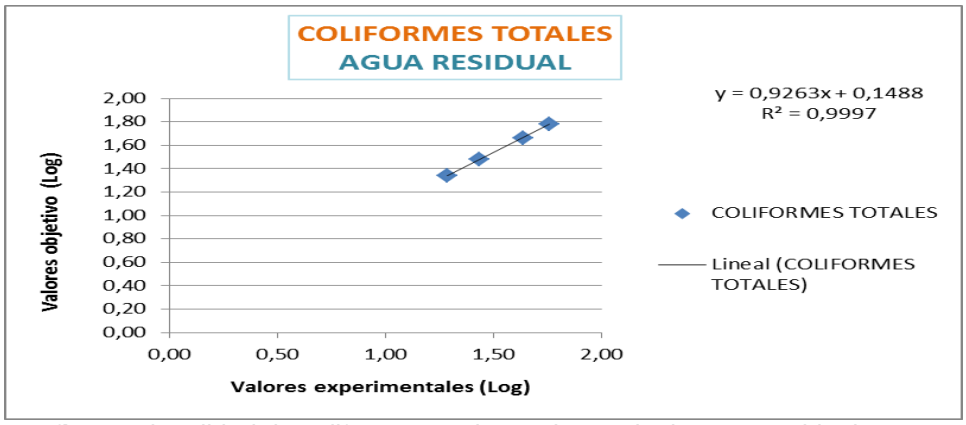
Fuente: La Autora

- ***Agua residual.***

Tabla 34: Valores experimentales (Y) y valores objetivo (X) de coliformes totales en la matriz de agua residual.

COLIFORMES TOTALES – AGUA RESIDUAL	
X	**Y**
1,78	**1,76**
1,66	**1,64**
1,48	**1,43**
1,34	**1,29**

Fuente: La Autora



Grafica 6: Linealidad de coliformes totales en la matriz de agua residual.

Fuente: La Autora

Tabla 35: Coeficiente de correlación y pendiente para coliformes totales en agua residual.

Criterio de aceptación	Resultado
Coeficiente de correlación	0,9998
Pendiente	0,9263

Fuente: La Autora

- ***Escherichia coli*.**

A continuación se exponen los resultados de linealidad para *Escherichia coli* en las tres matrices de agua seleccionadas (Agua potable, natural y residual).

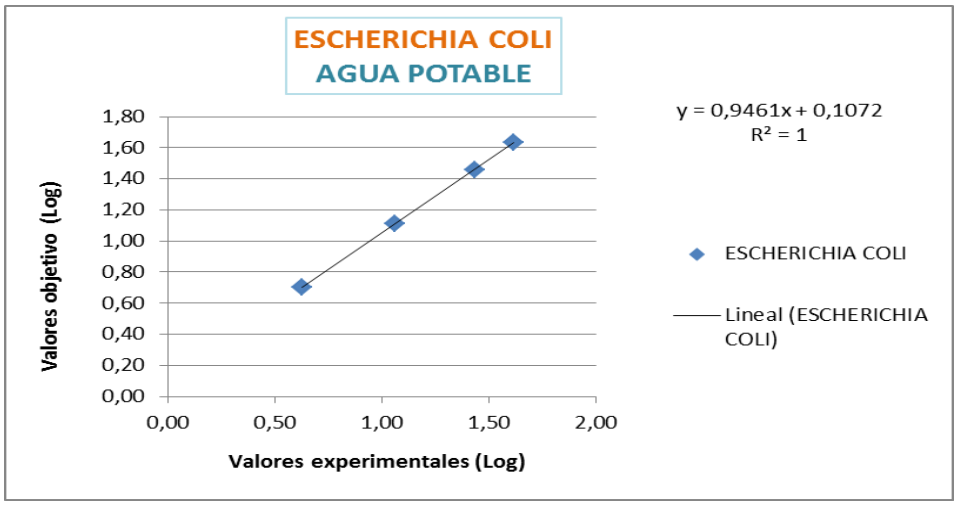
❖ ***Agua potable.***

Tabla 36: Valores experimentales (Y) y valores objetivo (X) de *Escherichia coli* en la matriz de agua potable.

Escherichia coli – Agua potable	
X	**Y**
1,63	**1,61**
1,46	**1,43**
1,11	**1,06**
0,70	**0,63**

Fuente: La Autora

Grafica 7: Linealidad de *Escherichia coli* en la matriz de agua potable.



Fuente: La Autora

Tabla 37: Coeficiente de correlación y pendiente para *Escherichia coli* en agua potable.

Criterio de aceptación	Resultado
Coeficiente de correlación	1
Pendiente	0,9461

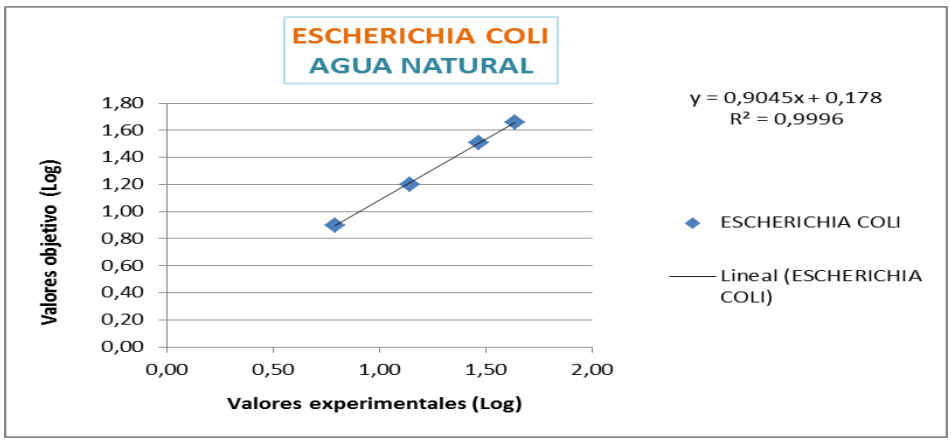
Fuente: La Autora

- ***Agua natural.***

Tabla 38: Valores experimentales (Y) y valores objetivo (X) de *Escherichia coli* en la matriz de agua natural.

Escherichia coli - Agua natural	
X	**Y**
1,66	**1,64**
1,51	**1,47**
1,20	**1,14**
0,90	**0,79**

Fuente: La Autora



Grafica 8: Linealidad de *Escherichia coli* en la matriz de agua natural.

Fuente: La Autora

Tabla 39: Coeficiente de correlación y pendiente para *Escherichia coli* en agua natural.

Criterio de aceptación	Resultado
Coeficiente de correlación	0.9998
Pendiente	0,9045

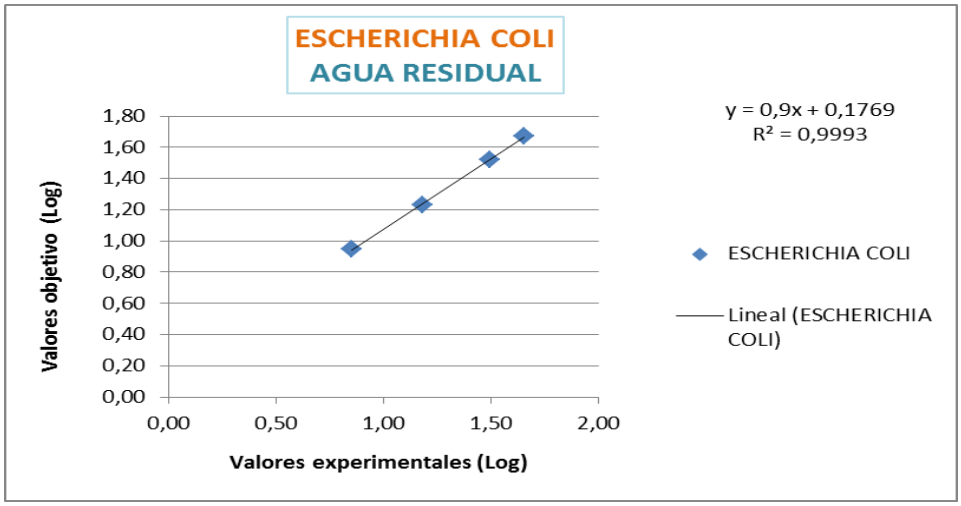
Fuente: La Autora

- ***Agua residual.***

Tabla 40: Valores experimentales (Y) y valores objetivo (X) de *Escherichia coli* en la matriz de agua residual.

Escherichia coli - Agua residual	
X	**Y**
1,67	**1,65**
1,52	**1,50**
1,23	**1,18**
0,95	**0,85**

Fuente: La Autora



Grafica 9: Linealidad de *Escherichia coli* en la matriz de agua residual.

Fuente: La Autora

Tabla 41: Coeficiente de correlación y pendiente para *Escherichia coli* en agua residual.

Criterio de aceptación	Resultado
Coeficiente de correlación	0.9997
Pendiente	0,9000

Fuente: La Autora

- **Pseudomona aeruginosa.**

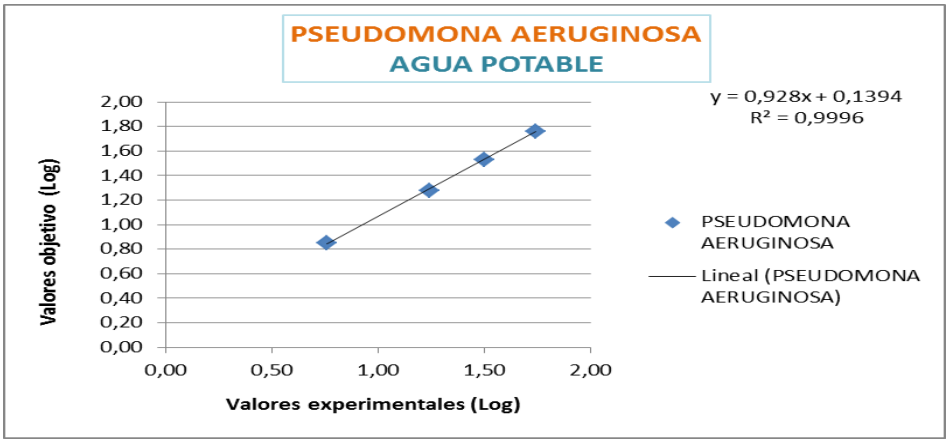
A continuación se exponen los resultados de linealidad para *Escherichia coli* en las tres matrices de agua seleccionadas (Agua potable, natural y residual).

❖ ***Agua Potable.***

Tabla 42: Valores experimentales (Y) y valores objetivo (X) de *Pseudomona aeruginosa* en la matriz de agua potable.

Pseudomona aeruginosa- Agua potable	
X	**Y**
1,76	**1,74**
1,53	**1,50**
1,28	**1,24**
0,85	**0,76**

Fuente: La Autora



Grafica 10: Linealidad de *Pseudomona aeruginosa* en la matriz de agua potable.

Fuente: La Autora

Tabla 43: Coeficiente de correlación y pendiente para *Pseudomona aeruginosa* en agua potable.

Criterio de aceptación	Resultado
Coeficiente de correlación	0.9998
Pendiente	0,9280

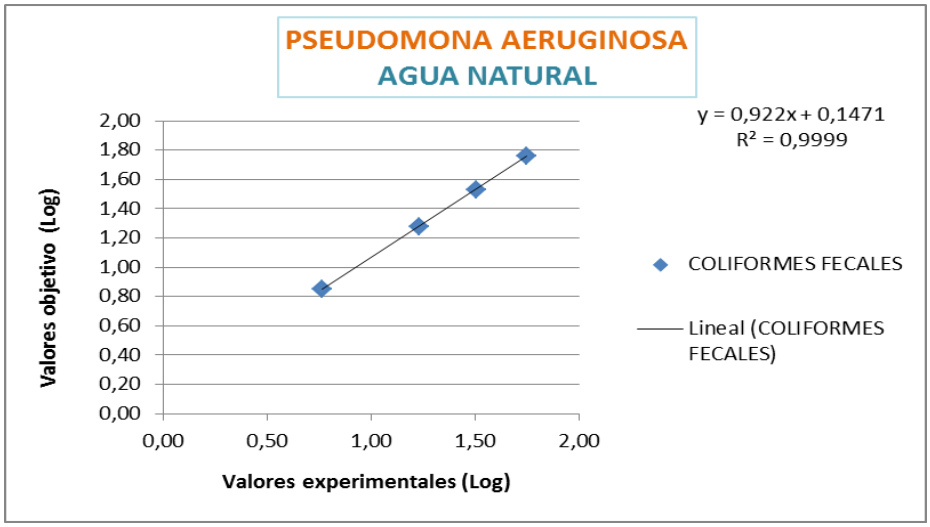
Fuente: La Autora

- ***Agua natural.***

Tabla 44: Valores experimentales (Y) y valores objetivo (X) de *Pseudomona aeruginosa* en la matriz de agua natural.

Pseudomona aeruginosa - AGUA NATURAL	
X	**Y**
1,76	**1,75**
1,53	**1,51**
1,28	**1,23**
0,85	**0,76**

Fuente: La Autora



Grafica 11: Linealidad de *Pseudomona aeruginosa* en la matriz de agua natural.

Fuente: La Autora

Tabla 45: Coeficiente de correlación y pendiente para *Pseudomona aeruginosa* en agua natural.

Criterio de aceptación	Resultado
Coeficiente de correlación	1
Pendiente	0,9220

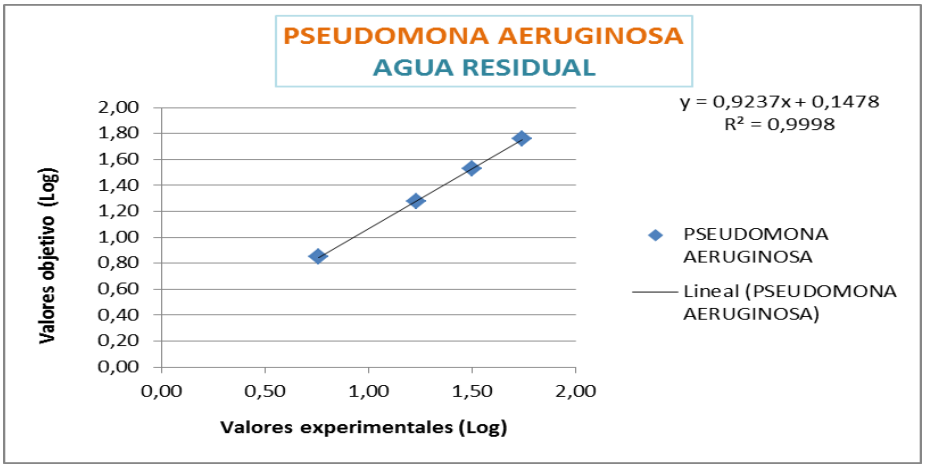
Fuente: La Autora

- ***Agua residual.***

Tabla 46: Valores experimentales (Y) y valores objetivo (X) de *Pseudomona aeruginosa* en la matriz de agua residual.

Pseudomona aeruginosa - AGUA RESIDUAL	
X	**Y**
1,76	**1,74**
1,53	**1,50**
1,28	**1,23**
0,85	**0,76**

Fuente: La Autora



Grafica 12: Linealidad de *Pseudomona aeruginosa* en la matriz de agua residual.

Fuente: La Autora

Tabla 47: Coeficiente de correlación y pendiente para *Pseudomona aeruginosa* en agua residual.

Criterio de aceptación	Resultado
Coeficiente de correlación	0,9999
Pendiente	0,9237

Fuente: La Autora

Discusión:

Para que exista linealidad entre las variables de estudio, el coeficiente de correlación (*r*) debe ser mayor a 0.9, mientras más próximo a 1, la relación es mejor; mientras que valores por debajo de 0.9 tienen una relación lineal baja o nula. Al evaluar la linealidad del método se puede observar que existe una excelente correlación entre las variables objetivo y las experimentales. Para este trabajo se estableció un coeficiente de correlación igual o superior a 0.995 y como se verifica en las tablas anteriores se ha obtenido coeficientes de correlación superiores al requisito, pendiente y coeficiente de determinación cercano a 1, con lo que queda confirmada y validada la linealidad del método de filtración por membrana para determinación de coliformes fecales, coliformes totales, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeuruginosa* para las matrices de agua potable natural y residual.

4.4. Límite de detección (LDD) y Límite de cuantificación

El límite de detección y cuantificación se calculó con el promedio de los microorganismos obtenidos en el nivel más bajo:

$$\text{LDD} = \bar{X}\ \boldsymbol{nivel\ más\ bajo}$$

El límite de cuantificación se estableció con el promedio de microorganismos detectados en el nivel más bajo en concentración más tres veces su desviación estándar:

$$LDC = LDD + 3S$$

A continuación se muestran los resultados para cada matriz.

- **Coliformes fecales.**

Tabla 48: Límite de detección y cuantificación para coliformes fecales en la matriz de agua potable, natural y residual.

Agua Potable							
Nivel Referencia		Nº de repetición	Día 1	Día 2	Dia3	LDD	LDC
UFC	log10		UFC/100ml	UFC/100ml	UFC/100ml		
D 5	0,70	1	4	5	4	4	6
		2	4	4	5		
		3	5	4	5		
		4	4	4	4		
		5	4	5	4		
Agua Natural							
Nivel Referencia		Nº de repetición	Día 1	Día 2	Dia3	LDD	LDC
UFC	log10		UFC/100ml	UFC/100ml	UFC/100ml		
D 6	0,78	1	5	6	5	5	7
		2	6	5	5		
		3	5	4	4		
		4	4	5	4		
		5	5	5	5		
Agua Residual							
Nivel Referencia		Nº de repetición	Día 1	Día 2	Dia3	LDD	LDC
UFC	log10		UFC/100ml	UFC/100ml	UFC/100ml		
D 11	1,04	1	10	11	8	9	12
		2	9	10	9		
		3	10	10	9		
		4	8	9	11		
		5	9	8	10		

Fuente: La Autora

- **Coliformes totales.**

Tabla 49: Límite de detección y cuantificación para coliformes totales en la matriz de agua potable, natural y residual.

Agua Potable							
Nivel Referencia		Nº de repetición	Día 1	Día 2	Dia3	LDD	LDC
UFC	log10		UFC/100ml	UFC/100ml	UFC/100ml		
D 5	0,70	1	4	4	5	4	5
		2	5	4	4		
		3	4	4	4		
		4	4	4	4		
		5	4	5	4		
Agua Natural							
Nivel Referencia		Nº de repetición	Día 1	Día 2	Dia3	LDD	LDC
UFC	log10		UFC/100ml	UFC/100ml	UFC/100ml		
D 14	1,15	1	13	11	13	12	16
		2	13	12	14		
		3	12	12	12		
		4	14	13	9		
		5	12	11	13		
Agua Residual							
Nivel Referencia		Nº de repetición	Día 1	Día 2	Dia3	LDD	LDC
UFC	log10		UFC/100ml	UFC/100ml	UFC/100ml		
D 22	1,34	1	21	19	17	19	26
		2	20	17	19		
		3	20	21	18		
		4	21	19	25		
		5	19	16	20		

Fuente: La Autora

- ***Escherichia coli*.**

Tabla 50: Límite de detección y cuantificación para *Escherichia coli* en la matriz de agua potable, natural y residual.

Agua Potable							
Nivel Referencia		Nº de repetición	Día 1	Día 2	Dia3	LDD	LDC
UFC	log10		UFC/100ml	UFC/100ml	UFC/100ml		
D 5	0,70	1	5	4	4	4	6
		2	4	5	4		
		3	4	4	5		
		4	4	5	4		
		5	4	4	4		

Agua Natural							
Nivel Referencia		Nº de repetición	Día 1	Día 2	Dia3	LDD	LDC
UFC	log10		UFC/100ml	UFC/100ml	UFC/100ml		
D 8	0,90	1	7	6	6	6	9
		2	5	7	7		
		3	6	6	6		
		4	6	5	5		
		5	7	8	7		
Agua Residual							
Nivel Referencia		Nº de repetición	Día 1	Día 2	Dia3	LDD	LDC
UFC	log10		UFC/100ml	UFC/100ml	UFC/100ml		
D 9	0,95	1	8	9	7	7	11
		2	7	6	7		
		3	6	8	6		
		4	9	6	6		
		5	6	8	9		

Fuente: La Autora

- **Pseudomona Aeruginosa.**

Tabla 51: Límite de detección y cuantificación para *Pseudomona aeruginosa* en la matriz de agua potable, natural y residual.

Agua Potable							
Nivel Referencia		Nº de repetición	Día 1	Día 2	Día 3	LDD	LDC
UFC	log10		UFC/100ml	UFC/100ml	UFC/100ml		
D 7	0,85	1	7	6	5	6	8
		2	5	7	6		
		3	6	5	5		
		4	5	5	6		
		5	6	6	7		
Agua Natural							
Nivel Referencia		Nº de repetición	Día 1	Día 2	Dia3	LDD	LDC
UFC	log10		UFC/100ml	UFC/100ml	UFC/100ml		
D 7	0,85	1	7	6	6	6	8
		2	5	6	5		
		3	6	6	5		
		4	6	7	6		
		5	5	5	6		

Agua Residual							
Nivel Referencia		Nº de repetición	Día 1	Día 2	Dia3	LDD	LDC
UFC	log_{10}		UFC/100ml	UFC/100ml	UFC/100ml		
D 7	0,85	1	6	5	6	6	8
		2	6	5	7		
		3	5	6	5		
		4	6	6	6		
		5	5	7	5		

Fuente: La Autora

Discusión:

En las tablas anteriores se presenta los resultados del LDD y LDC para cada ensayo, el LDD es generalmente un parámetro cualitativo, mientras que el LDC es el parámetro que nos indica la cantidad mínima de microorganismos que pueden ser determinados con precisión.

La referencia bibliográfica nos indica que el LDC no debe exceder el 20% del coeficiente de variación (Guía para la validación de métodos en la industria bioanalítica)

Como se observa, los límites de cuantificación no son valores próximos a cero, esto es debido a que el nivel más bajo es de 5 UFC para la cepa de *Escherichia coli* y 7 UFC para la cepa de *Pseudomona aeruginosa,* además de que se está validando los métodos en cada matriz, con lo que aumenta el valor del límite inferior de trabajo.

4.5. Recuperación

Para evaluar la eficiencia del método se calculó la recuperación porcentual, utilizando cada resultado experimental para el valor objetivo (C.M.C) como se muestra en la siguiente ecuación:

$$\%R = \frac{\mathrm{X}}{\mathrm{C.M.C}} * 100$$

A continuación se exponen las tablas de recuperación para cada ensayo el criterio de aceptación establecido para la validación es de 80 – 110 %.

Tabla 52: Recuperación para coliformes fecales en la matriz de agua potable

Nivel Referencia		Nº de repeticion	Dia 1			Dia 2			Dia3		
ufc	C.M.C.		ufc/100ml	Resultado experimental (Log)	%R	ufc/100ml	Resultado experimental (Log)	%R	ufc/100ml	Resultado experimental (Log)	%R
		1	42	1,62	99,37	41	1,61	99,36	40	1,60	98,69
		2	40	1,60	98,08	42	1,62	100,00	40	1,60	98,69
A		3	43	1,63	100,00	40	1,60	98,69	41	1,61	99,36
43	1,63	4	42	1,62	99,37	42	1,62	100,00	39	1,59	98,02
		5	42	1,62	99,37	41	1,61	99,36	41	1,61	99,36
		1	29	1,46	100,00	28	1,45	98,96	27	1,43	97,88
		2	28	1,45	98,96	27	1,43	97,88	29	1,46	100,00
B		3	26	1,41	96,76	29	1,46	100,00	28	1,45	98,96
29	1,46	4	28	1,45	98,96	28	1,45	98,96	28	1,45	98,96
		5	28	1,45	98,96	25	1,40	95,59	27	1,43	97,88
		1	13	1,11	100,00	13	1,11	100,00	12	1,08	96,88
		2	10	1,00	89,77	12	1,08	96,88	12	1,08	96,88
C		3	12	1,08	96,88	11	1,04	93,49	11	1,04	93,49
13	1,11	4	10	1,00	89,77	12	1,08	96,88	13	1,11	100,00
		5	12	1,08	96,88	11	1,04	93,49	11	1,04	93,49
		1	4	0,60	86,14	5	0,70	100,00	4	0,60	86,14
		2	4	0,60	86,14	4	0,60	86,14	5	0,70	100,00
D		3	5	0,70	100,00	4	0,60	86,14	5	0,70	100,00
5	0,70	4	4	0,60	86,14	4	0,60	86,14	4	0,60	86,14
		5	4	0,60	86,14	5	0,70	100,00	4	0,60	86,14

Fuente: La Autora

Tabla 53: Recuperación para coliformes fecales en la matriz de agua natural.

Nivel Referencia		Nº de repeticion	Dia 1			Dia 2			Dia3		
ufc	C.M.C.		ufc/100ml	Resultado experimental (Log)	%R	ufc/100ml	Resultado experimental (Log)	%R	ufc/100ml	Resultado experimental (Log)	%R
		1	43	1,63	99,39	42	1,62	100,00	41	1,61	99,36
		2	42	1,62	98,77	43	1,63	100,63	44	1,64	101,24
A		3	40	1,60	97,48	42	1,62	100,00	42	1,62	100,00
44	1,64	4	42	1,62	98,77	42	1,62	100,00	41	1,61	99,36
		5	42	1,62	98,77	41	1,61	99,36	42	1,62	100,00
		1	29	1,46	99,00	27	1,43	96,90	28	1,45	97,97
		2	28	1,45	97,97	29	1,46	99,00	28	1,45	97,97
B		3	28	1,45	97,97	28	1,45	97,97	27	1,43	96,90
30	1,48	4	28	1,45	97,97	29	1,46	99,00	28	1,45	97,97
		5	30	1,48	100,00	28	1,45	97,97	28	1,45	97,97
		1	11	1,04	90,86	12	1,08	94,16	13	1,11	97,19
		2	12	1,08	94,16	13	1,11	97,19	13	1,11	97,19
C		3	12	1,08	94,16	12	1,08	94,16	12	1,08	94,16
14	1,15	4	13	1,11	97,19	12	1,08	94,16	12	1,08	94,16
		5	12	1,08	94,16	14	1,15	100,00	13	1,11	97,19
		1	5	0,70	89,82	6	0,78	100,00	5	0,70	89,82
		2	6	0,78	100,00	5	0,70	89,82	5	0,70	89,82
D		3	5	0,70	89,82	5	0,70	89,82	5	0,70	89,82
6	0,78	4	5	0,70	89,82	5	0,70	89,82	5	0,70	89,82
		5	5	0,70	89,82	5	0,70	89,82	5	0,70	89,82

Fuente: La Autora

Tabla 54: Recuperación para coliformes fecales en la matriz de agua residual.

Nivel Referencia		Nº de repeticion	Dia 1			Dia 2			Dia3		
ufc	C.M.C.		ufc/100ml	Resultado experimental (Log)	%R	ufc/100ml	Resultado experimental (Log)	%R	ufc/100ml	Resultado experimental (Log)	%R
		1	48	1,68	99,47	49	1,69	101,08	48	1,68	100,55
		2	42	1,62	96,04	47	1,67	100,00	47	1,67	100,00
A		3	49	1,69	100,00	48	1,68	100,55	47	1,67	100,00
49	1,69	4	47	1,67	98,93	47	1,67	100,00	48	1,68	100,55
		5	46	1,66	98,38	47	1,67	100,00	47	1,67	100,00
		1	33	1,52	98,35	32	1,51	97,48	35	1,54	100,00
		2	35	1,54	100,00	34	1,53	99,18	30	1,48	95,66
B		3	34	1,53	99,18	33	1,52	98,35	33	1,52	98,35
35	1,54	4	33	1,52	98,35	33	1,52	98,35	34	1,53	99,18
		5	34	1,53	99,18	34	1,53	99,18	32	1,51	97,48
		1	15	1,18	91,97	18	1,26	98,16	17	1,23	96,22
		2	17	1,23	96,22	19	1,28	100,00	16	1,20	94,16
C		3	18	1,26	98,16	17	1,23	96,22	17	1,23	96,22
19	1,28	4	16	1,20	94,16	16	1,20	94,16	17	1,23	96,22
		5	17	1,23	96,22	17	1,23	96,22	18	1,26	98,16
		1	10	1,00	96,03	11	1,04	100,00	8	0,90	86,72
		2	9	0,95	91,63	10	1,00	96,03	9	0,95	91,63
D		3	10	1,00	96,03	10	1,00	96,03	9	0,95	91,63
11	1,04	4	8	0,90	86,72	9	0,95	91,63	11	1,04	100,00
		5	9	0,95	91,63	8	0,90	86,72	10	1,00	96,03

Fuente: La Autora

Tabla 55: Recuperación para coliformes totales en la matriz de agua potable.

Nivel Referencia		Nº de repeticion	Dia 1			Dia 2			Dia3		
ufc	C.M.C.		ufc/100ml	Resultado experimental (Log)	%R	ufc/100ml	Resultado experimental (Log)	%R	ufc/100ml	Resultado experimental (Log)	%R
		1	41	1,61	98,73	41	1,61	98,73	42	1,62	99,37
		2	43	1,63	100,00	42	1,62	99,37	41	1,61	98,73
A		3	42	1,62	99,37	42	1,62	99,37	42	1,62	99,37
43	1,63	4	40	1,60	98,08	40	1,60	98,08	40	1,60	98,08
		5	41	1,61	98,73	41	1,61	98,73	40	1,60	98,08
		1	29	1,46	100,00	28	1,45	98,96	26	1,41	96,76
		2	27	1,43	97,88	24	1,38	94,38	26	1,41	96,76
B		3	28	1,45	98,96	27	1,43	97,88	27	1,43	97,88
29	1,46	4	28	1,45	98,96	28	1,45	98,96	26	1,41	96,76
		5	27	1,43	97,88	27	1,43	97,88	25	1,40	95,59
		1	12	1,08	96,88	13	1,11	100,00	12	1,08	96,88
		2	12	1,08	96,88	12	1,08	96,88	13	1,11	100,00
C		3	11	1,04	93,49	12	1,08	96,88	13	1,11	100,00
13	1,11	4	13	1,11	100,00	12	1,08	96,88	10	1,00	89,77
		5	11	1,04	93,49	11	1,04	93,49	12	1,08	96,88
		1	4	0,60	86,14	4	0,60	86,14	5	0,70	100,00
		2	5	0,70	100,00	4	0,60	86,14	4	0,60	86,14
D		3	4	0,60	86,14	4	0,60	86,14	4	0,60	86,14
5	0,70	4	4	0,60	86,14	4	0,60	86,14	4	0,60	86,14
		5	4	0,60	86,14	5	0,70	100,00	4	0,60	86,14

Fuente: La Autora

Tabla 56: Recuperación para coliformes totales en la matriz de agua natural.

Nivel Referencia		Nº de repeticion	Dia 1			Dia 2			Dia3		
ufc	C.M.C.		ufc/100ml	Resultado experimental (Log)	%R	ufc/100ml	Resultado experimental (Log)	%R	ufc/100ml	Resultado experimental (Log)	%R
		1	50	1,70	99,01	48	1,68	97,97	51	1,71	99,51
		2	49	1,69	98,50	50	1,70	99,01	51	1,71	99,51
A		3	52	1,72	100,00	48	1,68	97,97	43	1,63	95,19
52	1,72	4	51	1,71	99,51	48	1,68	97,97	50	1,70	99,01
		5	50	1,70	99,01	49	1,69	98,50	51	1,71	99,51
		1	37	1,57	99,27	37	1,57	99,27	36	1,56	98,51
		2	36	1,56	98,51	37	1,57	99,27	36	1,56	98,51
B		3	36	1,56	98,51	36	1,56	98,51	31	1,49	94,40
38	1,58	4	37	1,57	99,27	33	1,52	96,12	37	1,57	99,27
		5	35	1,54	97,74	35	1,54	97,74	36	1,56	98,51
		1	21	1,32	98,50	20	1,30	96,92	19	1,28	95,26
		2	21	1,32	98,50	18	1,26	93,51	20	1,30	96,92
C		3	20	1,30	96,92	20	1,30	96,92	22	1,34	100,00
22	1,34	4	18	1,26	93,51	21	1,32	98,50	20	1,30	96,92
		5	22	1,34	100,00	21	1,32	98,50	19	1,28	95,26
		1	13	1,11	97,19	11	1,04	90,86	13	1,11	97,19
		2	13	1,11	97,19	12	1,08	94,16	14	1,15	100,00
D		3	12	1,08	94,16	12	1,08	94,16	12	1,08	94,16
14	1,15	4	14	1,15	100,00	13	1,11	97,19	9	0,95	83,26
		5	12	1,08	94,16	11	1,04	90,86	13	1,11	97,19

Fuente: La Autora

Tabla 57: Recuperación para coliformes totales en la matriz de agua residual.

Nivel Referencia		Nº de repeticion	Dia 1			Dia 2			Dia3		
ufc	C.M.C.		ufc/100ml	Resultado experimental (Log)	%R	ufc/100ml	Resultado experimental (Log)	%R	ufc/100ml	Resultado experimental (Log)	%R
		1	59	1,77	99,59	56	1,75	98,31	57	1,76	98,75
		2	57	1,76	98,75	57	1,76	98,75	56	1,75	98,31
A		3	61	1,79	100,40	55	1,74	97,87	57	1,76	98,75
60	1,78	4	58	1,76	99,17	56	1,75	98,31	58	1,76	99,17
		5	58	1,76	99,17	56	1,75	98,31	59	1,77	99,59
		1	43	1,63	98,24	44	1,64	98,84	44	1,64	98,84
		2	45	1,65	99,43	45	1,65	99,43	42	1,62	97,62
B		3	45	1,65	99,43	40	1,60	96,35	42	1,62	97,62
46	1,66	4	44	1,64	98,84	42	1,62	97,62	43	1,63	98,24
		5	42	1,62	97,62	43	1,63	98,24	46	1,66	100,00
		1	29	1,46	99,00	26	1,41	95,79	23	1,36	92,19
		2	30	1,48	100,00	26	1,41	95,79	26	1,41	95,79
C		3	28	1,45	97,97	27	1,43	96,90	28	1,45	97,97
30	1,48	4	27	1,43	96,90	28	1,45	97,97	29	1,46	99,00
		5	27	1,43	96,90	26	1,41	95,79	28	1,45	97,97
		1	21	1,32	98,50	19	1,28	95,26	17	1,23	91,66
		2	20	1,30	96,92	17	1,23	91,66	19	1,28	95,26
D		3	20	1,30	96,92	21	1,32	98,50	18	1,26	93,51
22	1,34	4	21	1,32	98,50	19	1,28	95,26	25	1,40	104,14
		5	19	1,28	95,26	16	1,20	89,70	20	1,30	96,92

Fuente: La autora

Tabla 58: Recuperación para *Escherichia coli* en la matriz de agua potable.

Nivel Referencia		Nº de repeticion	Dia 1			Dia 2			Dia3		
ufc	C.M.C.		ufc/100ml	Resultado experimental (Log)	%R	ufc/100ml	Resultado experimental (Log)	%R	ufc/100ml	Resultado experimental (Log)	%R
		1	42	1,62	99,37	41	1,61	98,73	42	1,62	99,37
		2	41	1,61	98,73	42	1,62	99,37	41	1,61	98,73
A		3	43	1,63	100,00	41	1,61	98,73	42	1,62	99,37
43	1,63	4	42	1,62	99,37	42	1,62	99,37	40	1,60	98,08
		5	40	1,60	98,08	38	1,58	96,71	39	1,59	97,40
		1	27	1,43	97,88	28	1,45	98,96	27	1,43	97,88
		2	28	1,45	98,96	26	1,41	96,76	27	1,43	97,88
B		3	27	1,43	97,88	26	1,41	96,76	25	1,40	95,59
29	1,46	4	26	1,41	96,76	29	1,46	100,00	27	1,43	97,88
		5	29	1,46	100,00	27	1,43	97,88	26	1,41	96,76
		1	11	1,04	93,49	12	1,08	96,88	12	1,08	96,88
		2	11	1,04	93,49	10	1,00	89,77	10	1,00	89,77
C		3	13	1,11	100,00	12	1,08	96,88	11	1,04	93,49
13	1,11	4	10	1,00	89,77	11	1,04	93,49	13	1,11	100,00
		5	12	1,08	96,88	12	1,08	96,88	12	1,08	96,88
		1	5	0,70	100,00	4	0,60	86,14	4	0,60	86,14
		2	4	0,60	86,14	5	0,70	100,00	4	0,60	86,14
D		3	4	0,60	86,14	4	0,60	86,14	5	0,70	100,00
5	0,70	4	4	0,60	86,14	5	0,70	100,00	4	0,60	86,14
		5	4	0,60	86,14	4	0,60	86,14	4	0,60	86,14

Fuente: La Autora

Tabla 59: Recuperación para *Escherichia coli* en la matriz de agua natural.

Nivel Referencia		Nº de repeticion	Dia 1			Dia 2			Dia3		
ufc	C.M.C.		ufc/100ml	Resultado experimental (Log)	%R	ufc/100ml	Resultado experimental (Log)	%R	ufc/100ml	Resultado experimental (Log)	%R
		1	43	1,63	98,24	42	1,62	97,62	46	1,66	100,00
		2	45	1,65	99,43	43	1,63	98,24	42	1,62	97,62
A		3	47	1,67	100,56	42	1,62	97,62	42	1,62	97,62
46	1,66	4	42	1,62	97,62	43	1,63	98,24	44	1,64	98,84
		5	43	1,63	98,24	45	1,65	99,43	43	1,63	98,24
		1	30	1,48	98,14	31	1,49	99,08	28	1,45	96,15
		2	32	1,51	100,00	30	1,48	98,14	31	1,49	99,08
B		3	29	1,46	97,16	29	1,46	97,16	29	1,46	97,16
32	1,51	4	31	1,49	99,08	29	1,46	97,16	28	1,45	96,15
		5	29	1,46	97,16	28	1,45	96,15	27	1,43	95,10
		1	14	1,15	95,18	13	1,11	92,51	14	1,15	95,18
		2	15	1,18	97,67	13	1,11	92,51	13	1,11	92,51
C		3	14	1,15	95,18	16	1,20	100,00	15	1,18	97,67
16	1,20	4	15	1,18	97,67	12	1,08	89,62	12	1,08	89,62
		5	13	1,11	92,51	15	1,18	97,67	14	1,15	95,18
		1	7	0,85	93,58	6	0,78	86,17	6	0,78	86,17
		2	6	0,78	86,17	7	0,85	93,58	7	0,85	93,58
D		3	6	0,78	86,17	6	0,78	86,17	6	0,78	86,17
8	0,90	4	6	0,78	86,17	6	0,78	86,17	6	0,78	86,17
		5	7	0,85	93,58	8	0,90	100,00	7	0,85	93,58

Fuente: La Autora

Tabla 60: Recuperación para *Escherichia coli* en la matriz de agua residual.

Nivel Referencia		Nº de repeticion	Dia 1			Dia 2			Dia3		
ufc	C.M.C.		ufc/100ml	Resultado experimental (Log)	%R	ufc/100ml	Resultado experimental (Log)	%R	ufc/100ml	Resultado experimental (Log)	%R
		1	44	1,64	98,29	45	1,65	98,87	45	1,65	98,87
		2	46	1,66	99,44	47	1,67	100,00	45	1,65	98,87
A		3	45	1,65	98,87	45	1,65	98,87	42	1,62	97,08
47	1,67	4	44	1,64	98,29	46	1,66	99,44	42	1,62	97,08
		5	46	1,66	99,44	44	1,64	98,29	46	1,66	99,44
		1	32	1,51	99,12	32	1,51	99,12	30	1,48	97,27
		2	30	1,48	97,27	32	1,51	99,12	33	1,52	100,00
B		3	31	1,49	98,21	30	1,48	97,27	32	1,51	99,12
33	1,52	4	33	1,52	100,00	33	1,52	100,00	32	1,51	99,12
		5	31	1,49	98,21	29	1,46	96,30	31	1,49	98,21
		1	15	1,18	95,58	14	1,15	93,15	16	1,20	97,86
		2	16	1,20	97,86	15	1,18	95,58	15	1,18	95,58
C		3	16	1,20	97,86	16	1,20	97,86	14	1,15	93,15
17	1,23	4	14	1,15	93,15	15	1,18	95,58	17	1,23	100,00
		5	15	1,18	95,58	16	1,20	97,86	14	1,15	93,15
		1	8	0,90	94,64	9	0,95	100,00	7	0,85	88,56
		2	7	0,85	88,56	6	0,78	81,55	7	0,85	88,56
D		3	6	0,78	81,55	8	0,90	94,64	6	0,78	81,55
9	0,95	4	9	0,95	100,00	6	0,78	81,55	6	0,78	81,55
		5	6	0,78	81,55	8	0,90	94,64	9	0,95	100,00

Fuente: La Autora

Tabla 61: Recuperación para *Pseudomona aeruginosa* en la matriz de agua potable.

Nivel Referencia		Nº de repeticion	Dia 1			Dia 2			Dia3		
ufc	C.M.C.		ufc/100ml	Resultado experimental (Log)	%R	ufc/100ml	Resultado experimental (Log)	%R	ufc/100ml	Resultado experimental (Log)	%R
		1	56	1,75	99,14	55	1,74	98,69	57	1,76	99,57
		2	55	1,74	98,69	56	1,75	99,14	56	1,75	99,14
A		3	55	1,74	98,69	54	1,73	98,24	57	1,76	99,57
58	1,76	4	52	1,72	97,31	56	1,75	99,14	54	1,73	98,24
		5	56	1,75	99,14	53	1,72	97,78	56	1,75	99,14
		1	31	1,49	97,38	32	1,51	98,28	32	1,51	98,28
		2	33	1,52	99,15	33	1,52	99,15	31	1,49	97,38
B		3	32	1,51	98,28	32	1,51	98,28	30	1,48	96,45
34	1,53	4	30	1,48	96,45	32	1,51	98,28	31	1,49	97,38
		5	31	1,49	97,38	32	1,51	98,28	30	1,48	96,45
		1	18	1,26	98,16	18	1,26	98,16	16	1,20	94,16
		2	19	1,28	100,00	17	1,23	96,22	17	1,23	96,22
C		3	18	1,26	98,16	17	1,23	96,22	16	1,20	94,16
19	1,28	4	17	1,23	96,22	18	1,26	98,16	18	1,26	98,16
		5	18	1,26	98,16	18	1,26	98,16	17	1,23	96,22
		1	7	0,85	100,00	6	0,78	92,08	5	0,70	82,71
		2	5	0,70	82,71	7	0,85	100,00	6	0,78	92,08
D		3	6	0,78	92,08	5	0,70	82,71	5	0,70	82,71
7	0,85	4	5	0,70	82,71	5	0,70	82,71	6	0,78	92,08
		5	6	0,78	92,08	6	0,78	92,08	7	0,85	100,00

Fuente: La Autora

Tabla 62: Recuperación para *Pseudomona aeruginosa* en la matriz de agua natural.

Nivel Referencia		Nº de repeticion	Dia 1			Dia 2			Dia3		
ufc	C.M.C.		ufc/100ml	Resultado experimental (Log)	%R	ufc/100ml	Resultado experimental (Log)	%R	ufc/100ml	Resultado experimental (Log)	%R
		1	57	1,76	99,57	56	1,75	99,14	52	1,72	97,31
		2	57	1,76	99,57	56	1,75	99,14	55	1,74	98,69
A		3	58	1,76	100,00	57	1,76	99,57	56	1,75	99,14
58	1,76	4	55	1,74	98,69	56	1,75	99,14	54	1,73	98,24
		5	54	1,73	98,24	56	1,75	99,14	55	1,74	98,69
		1	32	1,51	98,28	32	1,51	98,28	32	1,51	98,28
		2	31	1,49	97,38	33	1,52	99,15	30	1,48	96,45
B		3	33	1,52	99,15	30	1,48	96,45	31	1,49	97,38
34	1,53	4	32	1,51	98,28	33	1,52	99,15	33	1,52	99,15
		5	33	1,52	99,15	34	1,53	100,00	33	1,52	99,15
		1	17	1,23	96,22	18	1,26	98,16	17	1,23	96,22
		2	17	1,23	96,22	18	1,26	98,16	16	1,20	94,16
C		3	19	1,28	100,00	16	1,20	94,16	17	1,23	96,22
19	1,28	4	16	1,20	94,16	17	1,23	96,22	14	1,15	89,63
		5	18	1,26	98,16	19	1,28	100,00	16	1,20	94,16
		1	7	0,85	100,00	6	0,78	92,08	6	0,78	92,08
		2	5	0,70	82,71	6	0,78	92,08	5	0,70	82,71
D		3	6	0,78	92,08	6	0,78	92,08	5	0,70	82,71
7	0,85	4	6	0,78	92,08	7	0,85	100,00	6	0,78	92,08
		5	5	0,70	82,71	5	0,70	82,71	6	0,78	92,08

Fuente: La Autora

Tabla 63: Recuperación para *Pseudomona aeruginosa* en la matriz de agua residual.

Nivel Referencia		Nº de repeticion	Dia 1			Dia 2			Dia3		
ufc	C.M.C.		ufc/100ml	Resultado experimental (Log)	%R	ufc/100ml	Resultado experimental (Log)	%R	ufc/100ml	Resultado experimental (Log)	%R
		1	51	1,71	96,83	55	1,74	98,69	56	1,75	99,14
		2	57	1,76	99,57	57	1,76	99,57	57	1,76	99,57
A		3	52	1,72	97,31	54	1,73	98,24	50	1,70	96,34
58	1,76	4	56	1,75	99,14	57	1,76	99,57	56	1,75	99,14
		5	55	1,74	98,69	55	1,74	98,69	55	1,74	98,69
		1	33	1,52	99,15	32	1,51	98,28	30	1,48	96,45
		2	30	1,48	96,45	34	1,53	100,00	31	1,49	97,38
B		3	32	1,51	98,28	32	1,51	98,28	31	1,49	97,38
34	1,53	4	33	1,52	99,15	31	1,49	97,38	32	1,51	98,28
		5	29	1,46	95,49	33	1,52	99,15	33	1,52	99,15
		1	18	1,26	98,16	16	1,20	94,16	18	1,26	98,16
		2	18	1,26	98,16	16	1,20	94,16	17	1,23	96,22
C		3	17	1,23	96,22	18	1,26	98,16	18	1,26	98,16
19	1,28	4	19	1,28	100,00	17	1,23	96,22	17	1,23	96,22
		5	16	1,20	94,16	15	1,18	91,97	17	1,23	96,22
		1	6	0,78	92,08	5	0,70	82,71	6	0,78	92,08
		2	6	0,78	92,08	5	0,70	82,71	7	0,85	100,00
D		3	5	0,70	82,71	6	0,78	92,08	5	0,70	82,71
7	0,85	4	6	0,78	92,08	6	0,78	92,08	6	0,78	92,08
		5	5	0,70	82,71	7	0,85	100,00	5	0,70	82,71

Fuente: La Autora

Discusión:

Este parámetro nos indica la diferencia entre el valor verdadero y los valores experimentales. Como objetivo de validación se planteó una recuperación comprendida entre el 80 – 110 % en todos los niveles, este criterio corresponde con el porcentaje de aceptación que tiene establecido el laboratorio de Ingeniería Ambiental de la UTPL.

Como se puede observar en las tablas anteriores, en todos los ensayos se obtuvo una recuperación dentro de este rango; por tanto se concluye que la validación cumple con el criterio de aceptación tanto de validación como del laboratorio.

Para verificar la exactitud del método se realizan cartas control (ANEXO II), estas nos ayudan a comprobar si el método está dentro de los límites de control y nos muestra si se producen tendencias.

4.6. Repetibilidad

Para evaluar la repetibilidad se calculó el coeficiente de variación (este debe ser ≤15%)[7] de cada ensayo usando la siguiente ecuación:

$$CV = \frac{S}{\bar{X}} * 100$$

En las subsecuentes tablas se muestra todos los resultados.

- ***Coliformes* fecales.**

Tabla 64: Coeficiente de variación para coliformes fecales en agua potable, natural y residual

Coeficiente de variación - agua potable				
	NIVEL A	NIVEL B	NIVEL C	NIVEL D
Día 1	0,7	1,2	4,9	7,0
Día 2	0,5	1,7	2,9	8,3
Día 3	0,6	0,9	2,9	8,3
CV	0,6	1,3	3,5	7,9
Coeficiente de variación - agua natural				
	NIVEL A	NIVEL B	NIVEL C	NIVEL D
Día 1	0,8	0,9	2,4	9,0
Día 2	0,5	0,9	2,7	9,0
Día 3	0,8	0,5	1,7	8,0

CV	0,7	0,8	2,3	8,7
Coeficiente de variación - agua residual				
	NIVEL A	NIVEL B	NIVEL C	NIVEL D
Día 1	1,6	0,7	2,5	4,2
Día 2	0,5	0,7	2,3	5,4
Día 3	0,3	1,7	1,5	5,4
CV	0,8	1,0	2,1	5,0

Fuente: La Autora

- ***Coliformes totales.***

Tabla 65: Coeficiente de variación para coliformes totales en agua potable, natural y residual

Coeficiente de variación - agua potable				
	NIVEL A	NIVEL B	NIVEL C	NIVEL D
Día 1	0,7	0,9	2,9	7,0
Día 2	0,5	1,9	2,4	7,0
Día 3	0,7	0,8	4,3	7,0
CV	0,6	1,2	3,2	7,0
Coeficiente de variación - agua natural				
	NIVEL A	NIVEL B	NIVEL C	NIVEL D
Día 1	0,6	0,6	2,5	2,5
Día 2	0,5	1,3	2,1	2,9
Día 3	2,0	2,0	2,0	7,1
CV	1,0	1,3	2,2	4,2
Coeficiente de variación -agua residual				
	NIVEL A	NIVEL B	NIVEL C	NIVEL D
Día 1	0,6	0,8	1,4	1,4
Día 2	0,3	1,2	1,0	3,7
Día 3	0,5	1,0	2,8	5,0
CV	0,5	1,0	1,7	3,4

Fuente: La Autora

- ***Escherichia coli.***

Tabla 66: Coeficiente de variación para *Escherichia coli* en agua potable, natural y residual

Coeficiente de variación - agua potable				
	NIVEL A	NIVEL B	NIVEL C	NIVEL D
Día 1	0,7	1,3	4,1	7,0
Día 2	1,1	1,4	3,3	8,3
Día 3	0,9	1,0	4,1	7,0

CV	0,9	1,2	3,8	7,4
Coeficiente de variación - agua natural				
	NIVEL A	NIVEL B	NIVEL C	NIVEL D
Día 1	1,2	1,3	2,2	7,7
Día 2	0,7	1,1	4,5	9,6
Día 3	1,0	1,6	3,3	7,7
CV	1,0	1,3	3,3	8,3
Coeficiente de variación - agua residual				
	NIVEL A	NIVEL B	NIVEL C	NIVEL D
Día 1	0,6	1,0	2,0	9,1
Día 2	0,7	1,5	2,0	9,3
Día 3	1,1	1,1	3,1	8,6
CV	0,8	1,2	2,4	9,0

Fuente: La Autora

- ***Pseudomona aeruginosa.***

Tabla 67: Coeficiente de variación para *Pseudomona aeruginosa* en cada matriz.

Coeficiente de variación - agua potable				
	NIVEL A	NIVEL B	NIVEL C	NIVEL D
Día 1	0,7	1,0	1,4	8,1
Día 2	0,6	0,4	1,1	8,2
Día 3	0,5	0,8	1,8	8,2
CV	0,6	0,7	1,4	8,1
Coeficiente de variación - agua natural				
	NIVEL A	NIVEL B	NIVEL C	NIVEL D
Día 1	0,7	0,8	2,3	8,2
Día 2	0,2	1,4	2,3	6,7
Día 3	0,6	1,2	2,7	5,8
CV	0,5	1,1	2,4	6,9
Coeficiente de variación - agua residual				
	NIVEL A	NIVEL B	NIVEL C	NIVEL D
Día 1	1,1	1,7	2,3	5,7
Día 2	0,6	1,0	2,5	8,1
Día 3	1,3	1,0	1,1	8,1
CV	1,0	1,3	1,9	7,3

Fuente: La Autora

Discusión:

Para cada nivel en las diferentes matrices, se calculó el coeficiente de variación mediante la desviación estándar de los resultados experimentales, el criterio de aceptación para repetibilidad nos indica que el coeficiente de variación no debe de ser mayor al 15%.

Como se observa en las tablas anteriores, se cumple con este criterio ya que en todos los ensayos hay un coeficiente de variación menor al 15%[10]. También se observa (lógicamente), mientras se reduce en número de microorganismos el coeficiente de variación aumenta, siendo entonces una relación inversamente proporcional.

4.7. Reproducibilidad

Tomando en cuenta que la validación fue realizada por un sólo analista, para estimar la reproducibilidad se analizaron por duplicado las muestras en los cuatro niveles y se evaluaron las desviaciones estándar y medias de los resultados obtenidos, con el fin de determinar si el método es reproducible.

A continuación se presentan los resultados que se obtuvieron para cada ensayo.

Tabla 68: Reproducibilidad para coliformes fecales.

Coliformes fecales		
Agua Potable		
NIVEL	**SR**	**%RSR**
Nivel A	0,0085	0,5
Nivel B	0,0038	0,3
Nivel C	0,0096	0,9
Nivel D	0,0113	1,77
Agua Natural		
NIVEL	**SR**	**%RSR**
Nivel A	0,0014	0,1
Nivel B	0,0061	0,4
Nivel C	0,0122	1,1
Nivel D	0,0203	2,97
Agua residual		
NIVEL	**SR**	**%RSR**
Nivel A	0,0063	0,4
Nivel B	0,0068	0,4
Nivel C	0,0103	0,8
Nivel D	0,0087	0,90

Fuente: La Autora

Tabla 69: Reproducibilidad para coliformes totales.

Coliformes totales		
Agua Potable		
NIVEL	**SR**	**%RSR**
Nivel A	0,0021	0,1
Nivel B	0,0146	1,0
Nivel C	0,0040	0,4
Nivel D	0,0000	0,0
Agua Natural		
NIVEL	**SR**	**%RSR**
Nivel A	0,0082	0,5
Nivel B	0,0066	0,4
Nivel C	0,0048	0,4
Nivel D	0,0183	1,7
Agua residual		
NIVEL	**SR**	**%RSR**
Nivel A	0,0098	0,6
Nivel B	0,0051	0,3
Nivel C	0,0140	1,0
Nivel D	0,0217	1,7

Fuente: La Autora

Tabla 70: Reproducibilidad para *Escherichia coli*.

Escherichia coli		
Agua Potable		
NIVEL	**SR**	**%RSR**
Nivel A	0,0049	0,3
Nivel B	0,0085	0,6
Nivel C	0,0042	0,4
Nivel D	0,0112	1,78
Agua Natural		
NIVEL	**SR**	**%RSR**
Nivel A	0,0049	0,3
Nivel B	0,0119	0,8
Nivel C	0,0100	0,9
Nivel D	0,0067	0,84
Agua residual		
NIVEL	**SR**	**%RSR**
Nivel A	0,0071	0,4
Nivel B	0,0029	0,2
Nivel C	0,0004	0,0
Nivel D	0,0116	1,36

Fuente: La Autora

Tabla 71: Reproducibilidad para *Pseudomona aeruginosa.*

Pseudomona aeruginosa		
Agua Potable		
NIVEL	**SR**	**%RSR**
Nivel A	0,0052	0,3
Nivel B	0,0097	0,6
Nivel C	0,0154	1,2
Nivel D	0,0001	0,02
Agua Natural		
NIVEL	**SR**	**%RSR**
Nivel A	0,0077	0,4
Nivel B	0,0041	0,3
Nivel C	0,0223	1,8
Nivel D	0,0146	1,9
Agua residual		
NIVEL	**SR**	**%RSR**
Nivel A	0,0051	0,3
Nivel B	0,0080	0,5
Nivel C	0,0166	1,3
Nivel D	0,0058	0,8

Fuente: La Autora

Discusión:

El criterio de aceptación para determinar la reproducibilidad del método, es que el porcentaje sea inferior o igual al 3%[10]. En todos los ensayos se cumple con este requisito, con lo que se establece que el método es reproducible.

4.8. Rango de trabajo

Para determinar el rango de trabajo sobre el cual el método puede aplicarse, se tomó como límite inferior el límite de cuantificación y como todos los resultados están en función de la concentración (UFC/ml), no se considera un límite máximo, sino que se establece el rango de trabajo como ≥ al LDC de cada matriz.

Tabla 72: Rango de trabajo para coliformes fecales

Coliformes fecales	
MATRIZ	**RANGO DE TRABAJO**
POTABLE	≥ 6 UFC/100ml
NATURAL	≥ 7 UFC/100ml
RESIDUAL	≥ 12 UFC/100ml

Fuente: La Autora

Tabla 73: Rango de trabajo para coliformes totales

Coliformes totales	
MATRIZ	**RANGO DE TRABAJO**
POTABLE	≥ 5 UFC/100ml
NATURAL	≥ 16 UFC/100ml
RESIDUAL	≥ 26 UFC/100ml

Fuente: La Autora

Tabla 74: Rango de trabajo para *Escherichia coli*

Escherichia coli	
MATRIZ	**RANGO DE TRABAJO**
POTABLE	≥ 6 UFC/100ml
NATURAL	≥ 9 UFC/100ml
RESIDUAL	≥ 11 UFC/100ml

Fuente: La Autora

Tabla 75: Rango de trabajo para *Pseudomona aeruginosa*

Pseudomona aeruginosa	
MATRIZ	**RANGO DE TRABAJO**
POTABLE	≥ 8 UFC/100ml
NATURAL	≥ 8 UFC/100ml
RESIDUAL	≥ 8 UFC/100ml

Fuente: La Autora

Discusión:

Como se mencionó en la metodología, la validación de los métodos microbiológicos partió de una suspensión de bacterias con una concentración de 1000 UFC; a partir de esta se realizaron las suspensiones de trabajo hasta un valor teórico de 0 UFC (nivel más bajo), luego de que se realizó la siembra por vertido se verificó los valores reales, teniendo en el nivel más bajo: 5 UFC en la cepa de *Escherichia coli* y 7 UFC en la cepa de *Pseudomona aeruginosa.*

Como la validación se la realizó en cada matriz de agua, se tomó los valores más bajos, de tal manera que el conteo y verificación en las placas sea fácil. Por tanto se establece como rango de trabajo como todos los valores iguales o superiores al límite de cuantificación, tal como se muestra en las tablas anteriores. Es preferible dejar el rango de trabajo en esta forma, ya que así no se limita el alcance para la acreditación.

4.9. Incertidumbre

Los análisis microbiológicos se encuentran en la categoría de ensayos que no permiten realizar un cálculo riguroso metrológica y estadísticamente válido de la incertidumbre de medida. En el presente trabajo se estableció la incertidumbre del método porcentual, mediante el cálculo del error típico de cada microorganismo en el promedio de datos por nivel y utilizando la siguiente ecuación:

$$U = \frac{Error\ típico\ (microorganismo)}{\bar{X}} * 100$$

El error típico es una medida de la cuantía de error, en el pronóstico del valor objetivo (Y) para los valores experimentales (X) como se observa en la siguiente ecuación:

$$Error\ tipico = \sqrt{\frac{1}{(\mathrm{n}-2)}\left[\sum(Y-\bar{Y})^2 - \frac{[\sum(X-\bar{X})(Y-\bar{Y})]^2}{\sum(X-\bar{X})}\right]}$$

En las siguientes tablas se puede apreciar los resultados de incertidumbre para todos los ensayos:

Tabla 76: Incertidumbre para coliformes fecales en agua potable.

NIVEL	Sr	SR	Sr^2	SR^2	RAÍZ	U %
Nivel A	0,0099	0,0085	0,0001	0,0001	0,0131	1
Nivel B	0,0189	0,0038	0,0004	0,0000	0,0193	1
Nivel C	0,0389	0,0096	0,0015	0,0001	0,0401	4
Nivel D	0,0501	0,0113	0,0025	0,0001	0,0514	8

Fuente: La Autora

Tabla 77: Incertidumbre para coliformes fecales en agua natural.

NIVEL	Sr	SR	Sr^2	SR^2	RAÍZ	U %
Nivel A	0,0110	0,0014	0,0001	0,0000	0,0111	0,6839
Nivel B	0,0115	0,0061	0,0001	0,0000	0,0130	0,8988
Nivel C	0,0253	0,0122	0,0006	0,0001	0,0281	2,5757
Nivel D	0,0595	0,0203	0,0035	0,0004	0,0629	9,1954

Fuente: La Autora

Tabla 78: Incertidumbre para coliformes fecales en agua residual.

NIVEL	Sr	SR	Sr^2	SR^2	RAÍZ	U %
Nivel A	0,0160	0,0063	0,0003	0,0000	0,0171	1
Nivel B	0,0173	0,0068	0,0003	0,0000	0,0186	1
Nivel C	0,0261	0,0103	0,0007	0,0001	0,0280	2
Nivel D	0,0488	0,0087	0,0024	0,0001	0,0496	5

Fuente: La Autora

Tabla 79: Incertidumbre para coliformes totales en agua potable.

NIVEL	Sr	SR	Sr^2	SR^2	RAÍZ	U %
Nivel A	0,0105	0,0021	0,0001	0,0000	0,0107	1
Nivel B	0,0189	0,0146	0,0004	0,0002	0,0238	2
Nivel C	0,0354	0,0040	0,0013	0,0000	0,0356	3
Nivel D	0,0436	0,0000	0,0019	0,0000	0,0436	7

Fuente: La Autora

Tabla 80: Incertidumbre para coliformes totales en agua natural.

NIVEL	Sr	SR	Sr^2	SR^2	RAÍZ	U %
Nivel A	0,0209	0,0082	0,0004	0,0001	0,0225	1
Nivel B	0,0225	0,0066	0,0005	0,0000	0,0235	2
Nivel C	0,0290	0,0048	0,0008	0,0000	0,0294	2
Nivel D	0,0504	0,0183	0,0025	0,0003	0,0536	5

Fuente: La Autora

Tabla 81: Incertidumbre para coliformes totales en agua residual.

NIVEL	Sr	SR	Sr^2	SR^2	RAÍZ	U %
Nivel A	0,0087	0,0098	0,0001	0,0001	0,0131	1
Nivel B	0,0166	0,0051	0,0003	0,0000	0,0174	1
Nivel C	0,0272	0,0140	0,0007	0,0002	0,0306	2
Nivel D	0,0473	0,0217	0,0022	0,0005	0,0521	4

Fuente: La Autora

Tabla 82: Incertidumbre para *Escherichia coli* en agua potable.

NIVEL	Sr	SR	Sr^2	SR^2	RAÍZ	U %
Nivel A	0,0148	0,0049	0,0002	0,0000	0,0156	1
Nivel B	0,0180	0,0085	0,0003	0,0001	0,0199	1
Nivel C	0,0408	0,0042	0,0017	0,0000	0,0410	4
Nivel D	0,0468	0,0112	0,0022	0,0001	0,0481	8

Fuente: La Autora

Tabla 83: Incertidumbre para *Escherichia coli* en agua natural.

NIVEL	Sr	SR	Sr^2	SR^2	RAÍZ	U %
Nivel A	0,0164	0,0049	0,0003	0,0000	0,0171	1
Nivel B	0,0195	0,0119	0,0004	0,0001	0,0229	2
Nivel C	0,0393	0,0100	0,0015	0,0001	0,0406	4
Nivel D	0,0665	0,0067	0,0044	0,0000	0,0669	8

Fuente: La Autora

Tabla 84: Incertidumbre para *Escherichia coli* en agua residual.

NIVEL	Sr	SR	Sr^2	SR^2	RAÍZ	U %
Nivel A	0,0136	0,0071	0,0002	0,0001	0,0154	1
Nivel B	0,0185	0,0029	0,0003	0,0000	0,0187	1
Nivel C	0,0290	0,0004	0,0008	0,0000	0,0290	2
Nivel D	0,0768	0,0116	0,0059	0,0001	0,0776	9

Fuente: La Autora

Tabla 85: Incertidumbre para *Pseudomona aeruginosa* en agua potable.

NIVEL	Sr	SR	Sr^2	SR^2	RAÍZ	U %
Nivel A	0,0105	0,0052	0,0001	0,0000	0,0118	1
Nivel B	0,0118	0,0097	0,0001	0,0001	0,0153	1
Nivel C	0,0177	0,0154	0,0003	0,0002	0,0234	2
Nivel D	0,0619	0,0001	0,0038	0,0000	0,0619	8

Fuente: La Autora

Tabla 86: Incertidumbre para *Pseudomona aeruginosa* en agua natural.

NIVEL	Sr	SR	Sr^2	SR^2	RAÍZ	U %
Nivel A	0,0098	0,0077	0,0001	0,0001	0,0125	1
Nivel B	0,0171	0,0041	0,0003	0,0000	0,0176	1
Nivel C	0,0299	0,0223	0,0009	0,0005	0,0374	3
Nivel D	0,0530	0,0146	0,0028	0,0002	0,0549	7

Fuente: La Autora

Tabla 87: Incertidumbre para *Pseudomona aeruginosa* en agua residual.

NIVEL	Sr	SR	Sr^2	SR^2	RAÍZ	U %
Nivel A	0,0180	0,0051	0,0003	0,0000	0,0187	1
Nivel B	0,0194	0,0080	0,0004	0,0001	0,0209	1
Nivel C	0,0251	0,0166	0,0006	0,0003	0,0301	2
Nivel D	0,0546	0,0058	0,0030	0,0000	0,0550	7

Fuente: La Autora

Discusión:

Como ya se mencionó, los métodos microbiológicos no requieren un estudio riguroso de la incertidumbre, por lo cual se calculó la incertidumbre intrínseca (U) (evaluando el error típico de cada microorganismo) que es debida a la distribución de los microorganismos y está relacionada directamente con el número de colonias crecidas en la placa.

El criterio de aceptación (95% confianza) para la incertidumbre es que sea menor al 20%[10], por tanto se corrobora que todos los ensayos cumplen con el criterio de aceptación.

CAPÍTULO V
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

En base a la experiencia de los resultados de validación de todos los ensayos y a la experiencia obtenida en la aplicación del método, se llegó a las siguientes conclusiones:

- ✓ Se validó los métodos microbiológicos de filtración por membrana para la determinación de coliformes fecales, coliformes totales, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa* en las matrices de agua natural, potable y residual, considerando parámetros como linealidad, precisión, recuperación, incertidumbre

- ✓ Se determinó la linealidad (proporcionalidad) para cada ensayo en las matrices seleccionadas. Se determinó que se cumplió con los requisitos propuestos de correlación, determinación y pendiente con valores cercanos a 1, es decir que los datos obtenidos tienen relación precisa con los valores objetivos.

- ✓ El rango de trabajo de cada ensayo se determinó para todas las matrices como el valor igual o mayor a los límites de cuantificación.

- ✓ El límite de detección se calculó con el promedio de microorganismos en el nivel más bajo.

- ✓ El límite de cuantificación se determinó con el límite de detección más tres veces su desviación estándar.

- ✓ Se evaluó la recuperación del método, obteniendo valores que cumplen con el criterio de aceptación establecidos para la validación y por el laboratorio, el criterio es que este dentro de un rango de 70 – 120.

- ✓ Se comprobó la precisión del método en base a la repetibilidad y reproducibilidad, analizando los coeficientes de variación: para la repetibilidad los coeficientes de variación están dentro del límite de ≤15% y para la reproducibilidad también están dentro del límite de ≤3%.

- ✓ Se verificó que se cumple con el criterio de aceptabilidad para la incertidumbre que tiene que ser ≤20% para los niveles superiores.

- ✓ Con todos los parámetros evaluados y con todos los resultados dentro de los rangos de aceptación, es suficiente evidencia para concluir que los métodos están validados.

5.2. Recomendaciones

En base a la experiencia que se ha obtenido durante la validación, se sugiere las siguientes recomendaciones:

- ✓ Trabajar sólo con cepas de bacterias, medios de cultivo y material en general que sea de calidad, que tengan su certificado de calidad, con esto se mantiene la confiabilidad de los ensayos.

- ✓ Para preparar las suspensiones bacterianas, se recomienda utilizar cepas activadas hasta después de 48 h, ya que en esa etapa los microorganismos tienen una etapa de crecimiento adecuada y se asegura que la cepa no esté inactiva.

- ✓ Se debe preparar el material con total esterilidad. Se recomienda usar los medios de cultivo que vienen preparados en ampollas, tener mucho cuidado al momento de preparar las diluciones, puede haber error en el pipeteo o aforo.

- ✓ Al momento de colocar los medios de cultivo, abrir el vacío sólo en caso de que exista exceso de medio en la membrana.

- ✓ Tener cuidado al preparar las muestras de trabajo, especialmente con agua residual, se podría producir una sobre contaminación.

- ✓ Los equipos deben ser calibrados interna y externamente.

- ✓ Trabajar sólo en la cámara de flujo laminar, especialmente cuando se trabaje con *Pseudomona aeruginosa,* para evitar el riesgo de contaminación al exterior, usar el equipo de protección necesario y no salir del laboratorio con este.

- ✓ Eliminar los desechos, sólo luego de que han sido autoclavados.

- ✓ Se debe participar en pruebas interlaboratorio, para acreditar los métodos validados.

BIBLIOGRAFÍA

(1) **CARRILLO ZAPATA, E. L. C. A.,** (2009). *Validación del método de detección de coliformes totales y fecales en agua potable utilizando agar chromocult,* Pontificia Universidad Javeriana: Bogotá-Colombia. p. 97.

(2) *Guía para la calidad del agua potable*., (2013). [Citado el: 09 de junio del 2013]. Disponible en: http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3rev/es/index.html.

(3) **RICE, E. and others.** (2012). *Standar Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 22 Editions. Washington, Dc 20001-3710: American Public Health Association, American Water Works Association, Water Evironment Federation.

(4) **L&S CONSULTORES C.A.,** (2013). *Validación de Métodos, Nota técnica.* [Citado el: 26 de febrero de 2013]. Disponible en: www.lysconsultores.com.

(5) **ORGANISMO DE ACREDITACIÓN ECUATORIANO- OAE.,** (2006). *NTE INEN-ISO/IEC 17025:2006;* Criterios generales para la acreditación de laboratorios de ensayo y calibración. Ecuador.

(6) **ORGANISMO ARGENTINO DE ACREDITACIÓN.,** (2011). *Guía para la validación de métodos microbiológicos.* Argentina.

(7) **GUTIÉRREZ HUMBERTO, DE LA VARA ROMÁN**., (2012). *Análisis y Diseño de experimentos.* 3 Edition. México, ISBN 978-607-15-0725-9.

(8) **INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN.,** (2011). *Requisitos para la calidad del Agua*; Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1 108:2011. Quito-Ecuador.

(9) **PRESIDENCIA DE LA REPÚBLICA DEL ECUADOR.,** (2009). *Norma de calidad ambiental y de descarga de efluentes: Recurso Agua.* Anexo 1 Libro VI; Texto Unificado de Legislación Ambiental. Ministerio del Ambiente. Ecuador

(10) **COMISIÓN DEL CONTROL ANALÍTICO.,** (2011). *Criterios para la validación de métodos microbiológicos.* Estado de México.

(11) **SALAMANCA, U. DE: D. DE M. Y G.,** (2013). *Recuento de coliformes totales por filtración a través de membrana* [Citado el 13 de junio del 2013]. Disponible en: http://virus.usal.es/Web/demo_fundacua/demo2/Fil traMembColiT_auto.html.

(12) **GONZALEZ RANGEL OLGA M.A, MA**., (2010). *Control de calidad en laboratorios.*

(13) **MARTÍNEZ IZQUIERDO AM, PÉREZ AMARILLO JI, PÉREZ MONRÁS MF.,** (2011). *Microbiología y Parasitología Médica*, Pseudomonas. La Habana-Cuba. p.302-23.

(14) **CUESTA ALICIA I. QM FAO.,** (2009). *Validación de los métodos microbiológicos: protocolo de validación.* Norma ISO 17025:2006. Ecuador.

(15) **BÁEZ MUÑOZ MARÍA FERNANDA.,** (2009). ¨Validación de métodos de ensayo para el análisis de parámetros físico-químicos en aguas limpias y residuales en el laboratorio de medio ambiente¨ Ecuador.

(16) **INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA DE CHILE** (2010). ¨Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición¨.

(17) **CERCENADO EMILIA, CANTÓN RAFAEL.,** (2013). ¨Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos¨. ESPAÑA.

ANEXOS

ANEXO I

Memoria Fotográfica

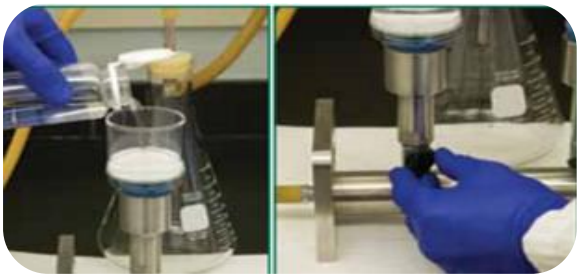


Imagen 17: Adición de la muestra de agua al portafiltros
Fuente: La Autora

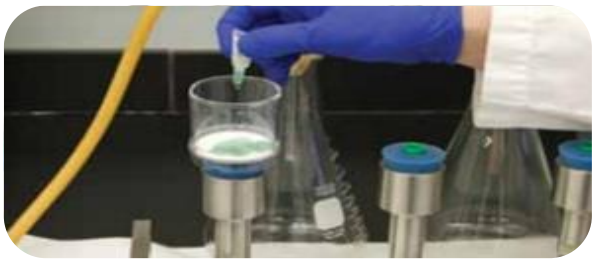


Imagen 18: Adición del medio selectivo
Fuente: La Autora

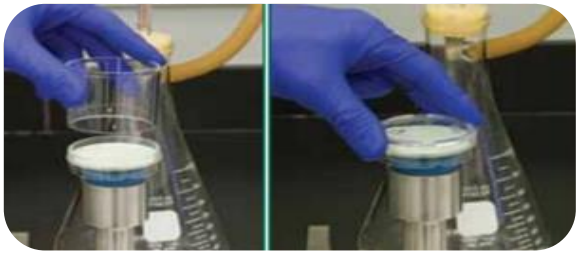


Imagen 19: Separación de la caja petri del embudo
Fuente: La Autora

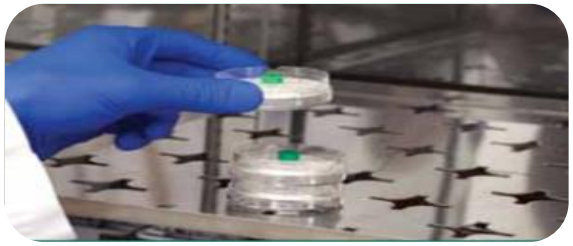


Imagen 20: Incubación de muestras apiladas
Fuente: La Autora

ANEXO II

CARTAS CONTROL

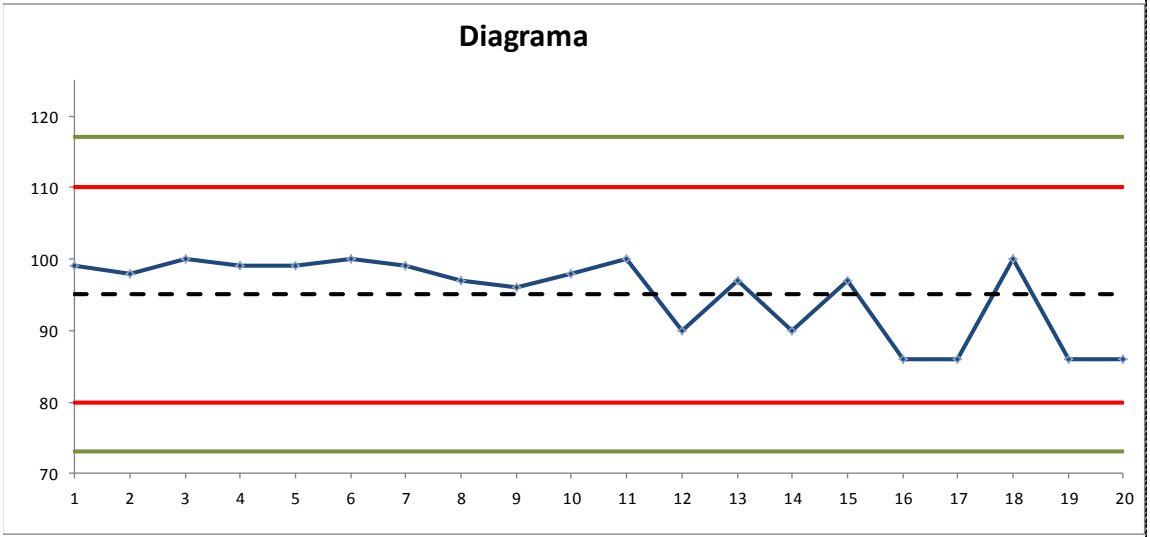
Carta Control R 5.9.3.

MUESTRA CONTROL:	Agua Potable
MÉTODO:	Filtracion por membrana
ANÁLISIS	Coliformes fecales
UNIDAD	% de recuperación

#	Fecha	Resultado	Responsable	Observación	
1	2014-03-03	99	Ing. Miguel Guamán	Muy Bien	
2	2014-03-03	98	Ing. Miguel Guamán	Muy Bien	
3	2014-03-03	100	Ing. Miguel Guamán	Muy bien	
4	2014-03-03	99	Ing. Miguel Guamán	Muy bien	
5	2014-03-03	99	Ing. Miguel Guamán	Muy bien	
6	2014-03-03	100	Ing. Miguel Guamán	Muy Bien	
7	2014-03-03	99	Ing. Miguel Guamán	Muy bien	
8	2014-03-03	97	Ing. Miguel Guamán	Bien	
9	2014-03-03	96	Ing. Miguel Guamán	OK	
10	2014-03-03	98	Ing. Miguel Guamán	Bien	
11	2014-03-03	100	Ing. Miguel Guamán	Muy bien	
12	2014-03-03	90	Ing. Miguel Guamán	Ok	
13	2014-03-03	97	Ing. Miguel Guamán	Bien	
14	2014-03-03	90	Ing. Miguel Guamán	OK	
15	2014-03-03	97	Ing. Miguel Guamán	Bien	
16	2014-03-03	86	Ing. Miguel Guamán	OK	
17	2014-03-03	86	Ing. Miguel Guamán	OK	
18	2014-03-03	100	Ing. Miguel Guamán	Muy bien	
19	2014-03-03	86	Ing. Miguel Guamán	OK	
20	2014-03-03	86	Ing. Miguel Guamán	OK	

Promedio
95
Lim. Inferior
80
Lim. Superior
110
Lim. Acción Inferior
73
Lim acción superior
117

Nueva hoja



CARTAS CONTROL

INGENIERÍA AMBIENTAL

CODIGO: R 5.9.3
REVISION: 0
FECHA: 2011-09-26
Elaborado por:
Patricio Puchaicela
Aprobado por:
Miguel Guamán.

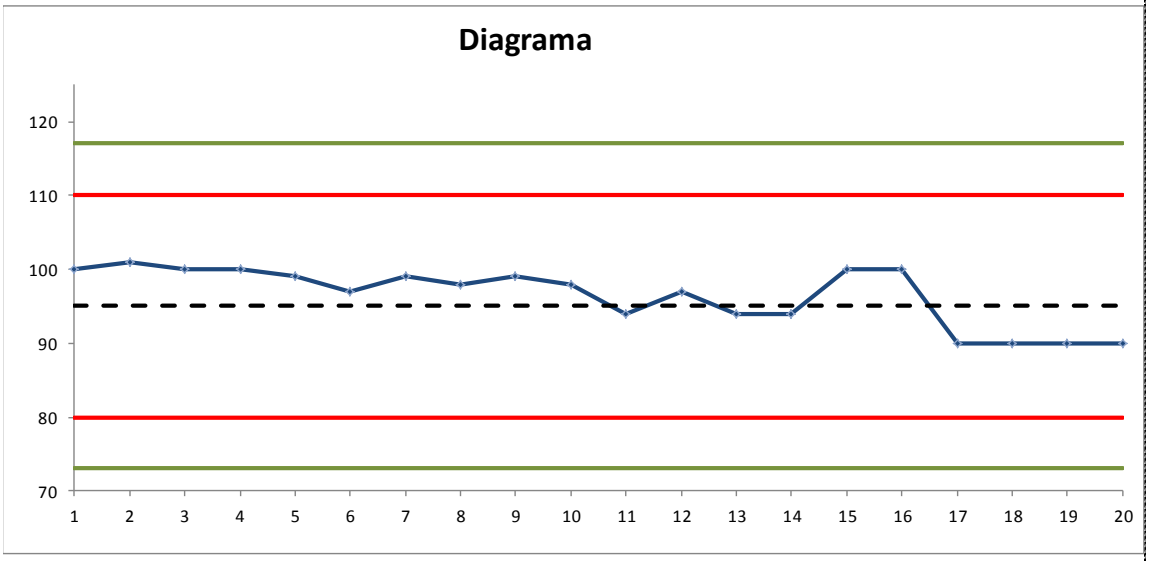
Carta Control R 5.9.3.

MUESTRA CONTROL:	Agua Natural
MÉTODO:	Filtracion por membrana
ANÁLISIS	Coliformes fecales
UNIDAD	% de recuperación

#	Fecha	Resultado	Responsable	Observación	
1	2014-03-04	100	Ing. Miguel Guamán	Muy bien	
2	2014-03-04	101	Ing. Miguel Guamán	Muy bien	
3	2014-03-04	100	Ing. Miguel Guamán	Muy bien	
4	2014-03-04	100	Ing. Miguel Guamán	Muy bien	
5	2014-03-04	99	Ing. Miguel Guamán	Bien	
6	2014-03-04	97	Ing. Miguel Guamán	Bien	
7	2014-03-04	99	Ing. Miguel Guamán	Bien	
8	2014-03-04	98	Ing. Miguel Guamán	Bien	
9	2014-03-04	99	Ing. Miguel Guamán	Bien	
10	2014-03-04	98	Ing. Miguel Guamán	Bien	
11	2014-03-04	94	Ing. Miguel Guamán	Bien	
12	2014-03-04	97	Ing. Miguel Guamán	Bien	
13	2014-03-04	94	Ing. Miguel Guamán	Bien	
14	2014-03-04	94	Ing. Miguel Guamán	Bien	
15	2014-03-04	100	Ing. Miguel Guamán	Muy bien	
16	2014-03-04	100	Ing. Miguel Guamán	Muy bien	
17	2014-03-04	90	Ing. Miguel Guamán	OK	
18	2014-03-04	90	Ing. Miguel Guamán	OK	
19	2014-03-04	90	Ing. Miguel Guamán	OK	
20	2014-03-04	90	Ing. Miguel Guamán	OK	

Promedio
95
Lim. Inferior
80
Lim. Superior
110
Lim. Acción Inferior
73
Lim acción superior
117

Nueva hoja



CARTAS CONTROL

INGENIERÍA AMBIENTAL

CODIGO: R 5.9.3
REVISION: 0
FECHA: 2011-09-26
Elaborado por:
Patricio Puchaicela
Aprobado por:
Miguel Guamán.

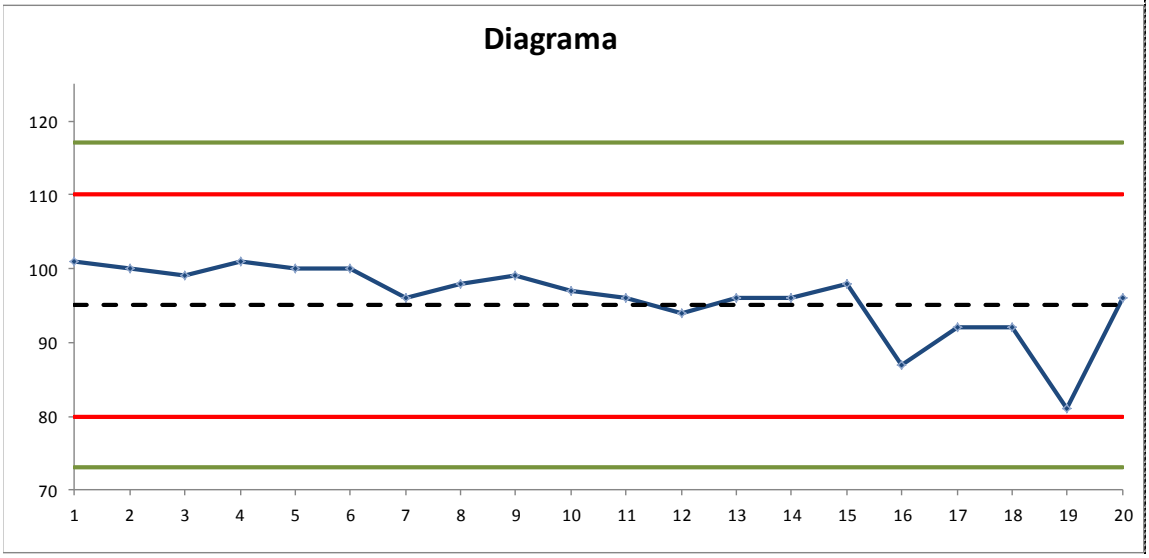
Carta Control R 5.9.3.

MUESTRA CONTROL:	Agua residual
MÉTODO:	Filtracion por membrana
ANÁLISIS	Coliformes fecales
UNIDAD	% de recuperación

#	Fecha	Resultado	Responsable	Observación	
1	2014-03-04	101	Ing. Miguel Guamán	Bien	
2	2014-03-04	100	Ing. Miguel Guamán	Muy bien	
3	2014-03-04	99	Ing. Miguel Guamán	Bien	
4	2014-03-04	101	Ing. Miguel Guamán	Bien	
5	2014-03-04	100	Ing. Miguel Guamán	Muy bien	
6	2014-03-04	100	Ing. Miguel Guamán	Muy bien	
7	2014-03-04	96	Ing. Miguel Guamán	Bien	
8	2014-03-04	98	Ing. Miguel Guamán	Bien	
9	2014-03-04	99	Ing. Miguel Guamán	Bien	
10	2014-03-04	97	Ing. Miguel Guamán	Bien	
11	2014-03-04	96	Ing. Miguel Guamán	OK	
12	2014-03-04	94	Ing. Miguel Guamán	OK	
13	2014-03-04	96	Ing. Miguel Guamán	Bien	
14	2014-03-04	96	Ing. Miguel Guamán	OK	
15	2014-03-04	98	Ing. Miguel Guamán	Bien	
16	2014-03-04	87	Ing. Miguel Guamán	OK	
17	2014-03-04	92	Ing. Miguel Guamán	OK	
18	2014-03-04	92	Ing. Miguel Guamán	Bien	
19	2014-03-04	81	Ing. Miguel Guamán	OK	
20	2014-03-04	96	Ing. Miguel Guamán	Muy bien	

Promedio
95
Lim. Inferior
80
Lim. Superior
110
Lim. Acción Inferior
73
Lim acción superior
117

Nueva hoja



DOCUMENTO CONTROLADO Y CONFIDENCIAL

CARTAS CONTROL

INGENIERÍA AMBIENTAL

CODIGO: R 5.9.3
REVISION: 0
FECHA: 2011-09-26
Elaborado por:
Patricio Puchaicela
Aprobado por:
Miguel Guamán.

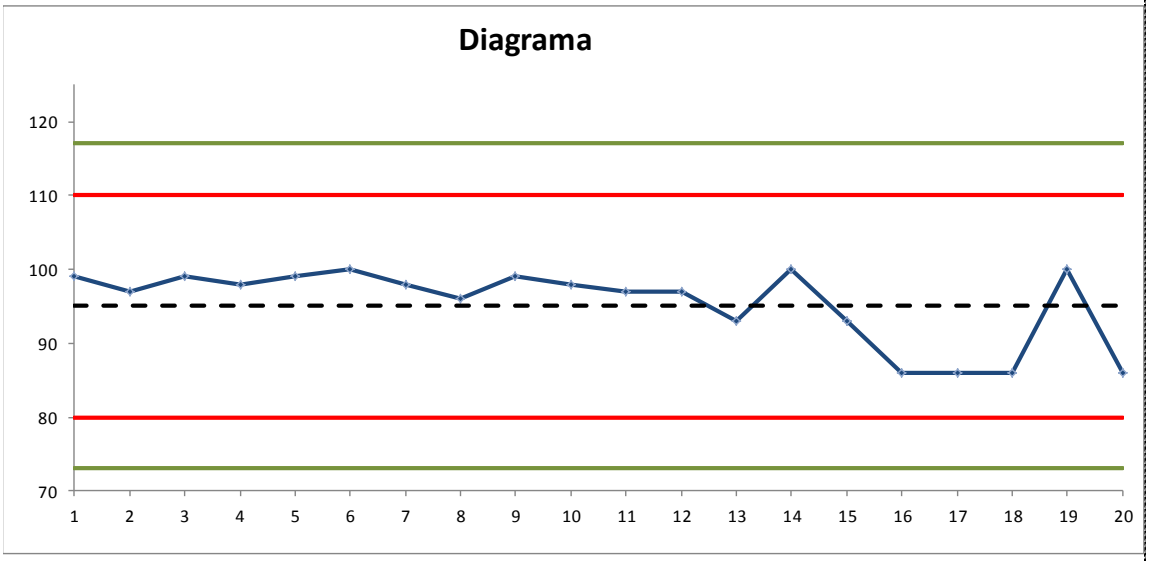
Carta Control R 5.9.3.

MUESTRA CONTROL:	Agua potable
MÉTODO:	Filtracion por membrana
ANÁLISIS	Coliformes totales
UNIDAD	% de recuperación

#	Fecha	Resultado	Responsable	Observación	
1	2014-03-04	99	Ing. Miguel Guamán	Bien	
2	2014-03-04	97	Ing. Miguel Guamán	Bien	
3	2014-03-04	99	Ing. Miguel Guamán	Bien	
4	2014-03-04	98	Ing. Miguel Guamán	Bien	
5	2014-03-04	99	Ing. Miguel Guamán	Bien	
6	2014-03-04	100	Ing. Miguel Guamán	Muy bien	
7	2014-03-04	98	Ing. Miguel Guamán	Bien	
8	2014-03-04	96	Ing. Miguel Guamán	Bien	
9	2014-03-04	99	Ing. Miguel Guamán	Muy bien	
10	2014-03-04	98	Ing. Miguel Guamán	Bien	
11	2014-03-04	97	Ing. Miguel Guamán	Bien	
12	2014-03-04	97	Ing. Miguel Guamán	Bien	
13	2014-03-04	93	Ing. Miguel Guamán	OK	
14	2014-03-04	100	Ing. Miguel Guamán	Muy bien	
15	2014-03-04	93	Ing. Miguel Guamán	OK	
16	2014-03-04	86	Ing. Miguel Guamán	OK	
17	2014-03-04	86	Ing. Miguel Guamán	OK	
18	2014-03-04	86	Ing. Miguel Guamán	OK	
19	2014-03-04	100	Ing. Miguel Guamán	Muy bien	
20	2014-03-04	86	Ing. Miguel Guamán	OK	

Promedio
95
Lim. Inferior
80
Lim. Superior
110
Lim. Acción Inferior
73
Lim acción superior
117

Nueva hoja



CARTAS CONTROL

INGENIERÍA AMBIENTAL

CODIGO: R 5.9.3
REVISION: 0
FECHA: 2011-09-26
Elaborado por:
Patricio Puchaicela
Aprobado por:
Miguel Guamán.

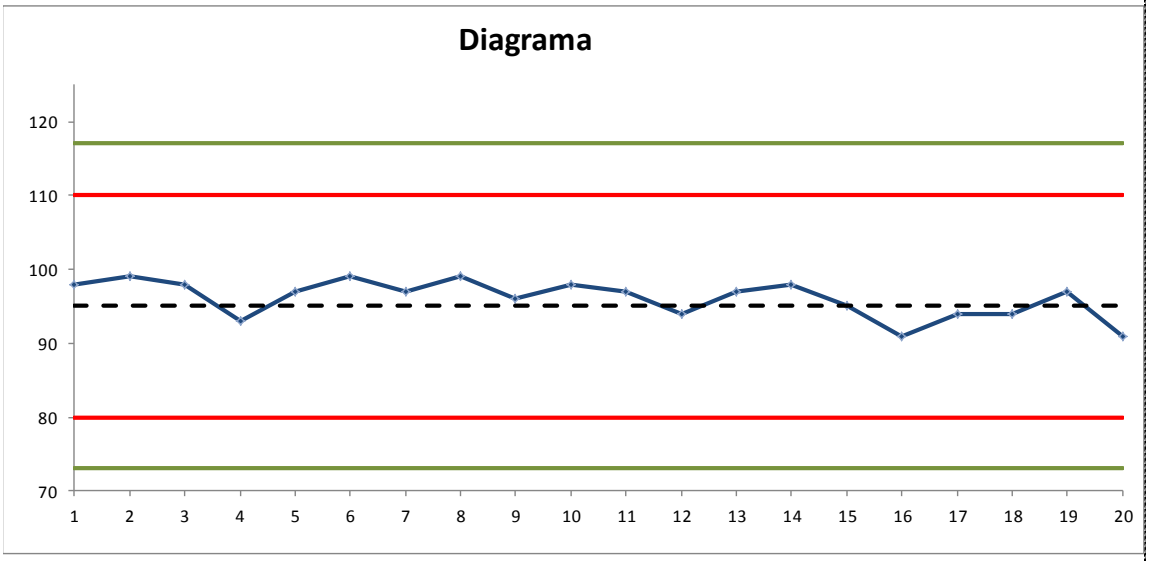
Carta Control R 5.9.3.

MUESTRA CONTROL:	Agua natural
MÉTODO:	Filtracion por membrana
ANÁLISIS	Coliformes totales
UNIDAD	% de recuperación

#	Fecha	Resultado	Responsable	Observación	
1	2014-03-04	98	Ing. Miguel Guamán	Bien	
2	2014-03-04	99	Ing. Miguel Guamán	Muy bien	
3	2014-03-04	98	Ing. Miguel Guamán	Bien	
4	2014-03-04	93	Ing. Miguel Guamán	OK	
5	2014-03-04	97	Ing. Miguel Guamán	Bien	
6	2014-03-04	99	Ing. Miguel Guamán	Muy bien	
7	2014-03-04	97	Ing. Miguel Guamán	Bien	
8	2014-03-04	99	Ing. Miguel Guamán	Muy bien	
9	2014-03-04	96	Ing. Miguel Guamán	OK	
10	2014-03-04	98	Ing. Miguel Guamán	Bien	
11	2014-03-04	97	Ing. Miguel Guamán	Bien	
12	2014-03-04	94	Ing. Miguel Guamán	OK	
13	2014-03-04	97	Ing. Miguel Guamán	Bien	
14	2014-03-04	98	Ing. Miguel Guamán	Muy bien	
15	2014-03-04	95	Ing. Miguel Guamán	OK	
16	2014-03-04	91	Ing. Miguel Guamán	OK	
17	2014-03-04	94	Ing. Miguel Guamán	OK	
18	2014-03-04	94	Ing. Miguel Guamán	OK	
19	2014-03-04	97	Ing. Miguel Guamán	Bien	
20	2014-03-04	91	Ing. Miguel Guamán	OK	

Promedio
95
Lim. Inferior
80
Lim. Superior
110
Lim. Acción Inferior
73
Lim acción superior
117

Nueva hoja



CARTAS CONTROL

INGENIERÍA AMBIENTAL

CODIGO: R 5.9.3
REVISION: 0
FECHA: 2011-09-26
Elaborado por:
Patricio Puchaicela
Aprobado por:
Miguel Guamán.

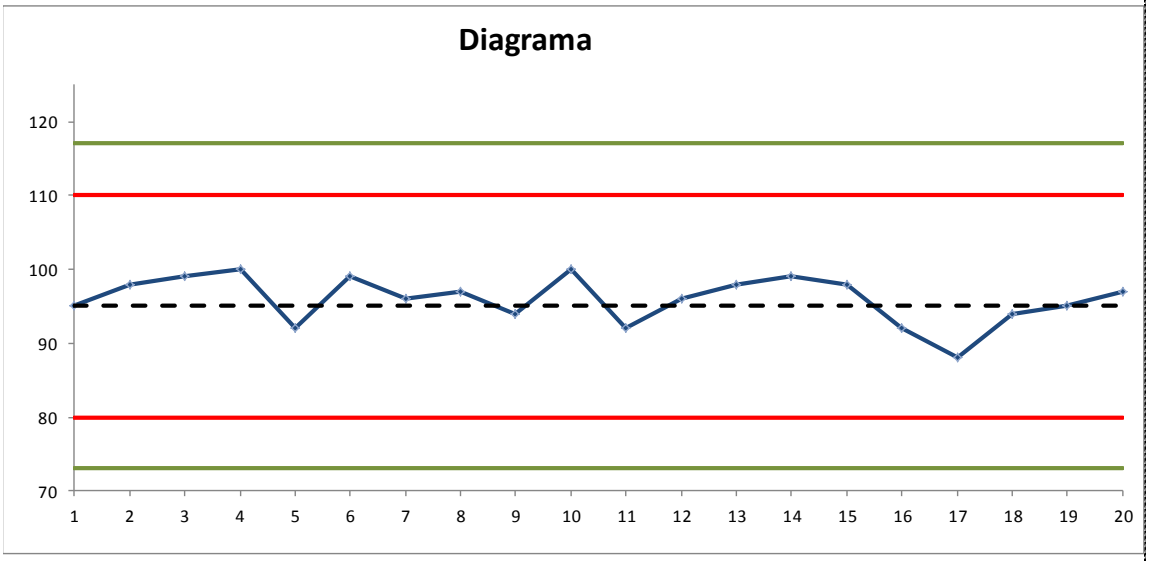
Carta Control R 5.9.3.

MUESTRA CONTROL:	Agua residual
MÉTODO:	Filtracion por membrana
ANÁLISIS	Coliformes totales
UNIDAD	% de recuperación

#	Fecha	Resultado	Responsable	Observación	
1	2014-03-04	95	Ing. Miguel Guamán	Bien	
2	2014-03-04	98	Ing. Miguel Guamán	Muy bien	
3	2014-03-04	99	Ing. Miguel Guamán	Muy bien	
4	2014-03-04	100	Ing. Miguel Guamán	Muy bien	
5	2014-03-04	92	Ing. Miguel Guamán	OK	
6	2014-03-04	99	Ing. Miguel Guamán	Muy bien	
7	2014-03-04	96	Ing. Miguel Guamán	Bien	
8	2014-03-04	97	Ing. Miguel Guamán	Muy bien	
9	2014-03-04	94	Ing. Miguel Guamán	Bien	
10	2014-03-04	100	Ing. Miguel Guamán	Muy bien	
11	2014-03-04	92	Ing. Miguel Guamán	OK	
12	2014-03-04	96	Ing. Miguel Guamán	Muy bien	
13	2014-03-04	98	Ing. Miguel Guamán	Muy bien	
14	2014-03-04	99	Ing. Miguel Guamán	Muy bien	
15	2014-03-04	98	Ing. Miguel Guamán	Bien	
16	2014-03-04	92	Ing. Miguel Guamán	Bien	
17	2014-03-04	88	Ing. Miguel Guamán	OK	
18	2014-03-04	94	Ing. Miguel Guamán	OK	
19	2014-03-04	95	Ing. Miguel Guamán	OK	
20	2014-03-04	97	Ing. Miguel Guamán	Bien	

Promedio
95
Lim. Inferior
80
Lim. Superior
110
Lim. Acción Inferior
73
Lim acción superior
117

Nueva hoja



DOCUMENTO CONTROLADO Y CONFIDENCIAL

CARTAS CONTROL

INGENIERÍA AMBIENTAL

CODIGO: R 5.9.3
REVISION: 0
FECHA: 2011-09-26
Elaborado por:
Patricio Puchaicela
Aprobado por:
Miguel Guamán.

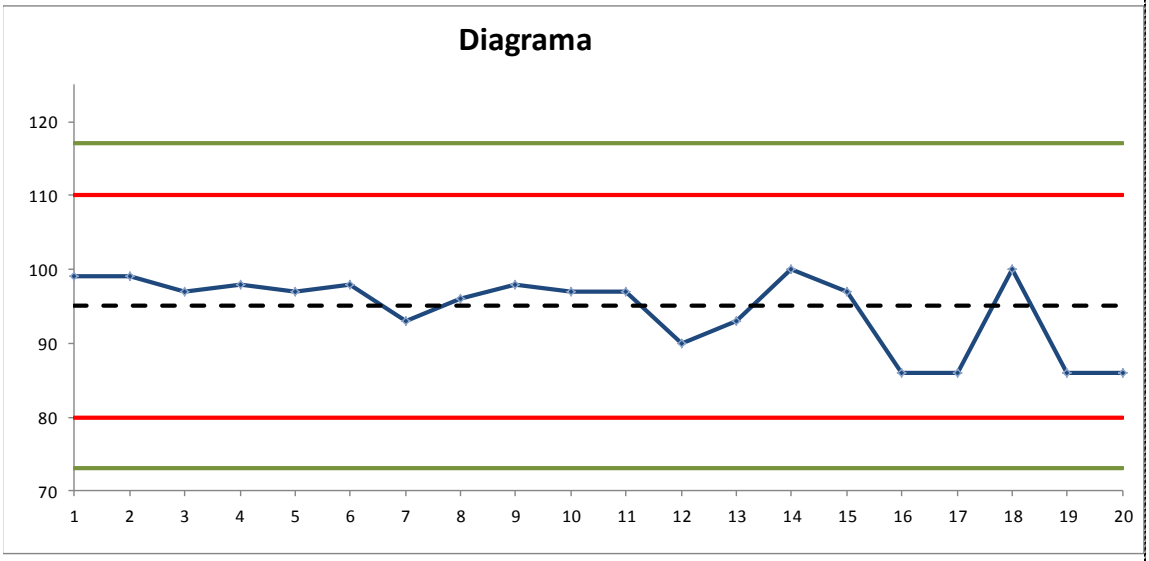
Carta Control R 5.9.3.

MUESTRA CONTROL:	Agua potable
MÉTODO:	Filtracion por membrana
ANÁLISIS	*Escherichia coli*
UNIDAD	% de recuperación

#	Fecha	Resultado	Responsable	Observación	
1	2014-03-04	99	Ing. Miguel Guamán	Muy bien	
2	2014-03-04	99	Ing. Miguel Guamán	Muy bien	
3	2014-03-04	97	Ing. Miguel Guamán	Bien	
4	2014-03-04	98	Ing. Miguel Guamán	Muy bien	
5	2014-03-04	97	Ing. Miguel Guamán	Bien	
6	2014-03-04	98	Ing. Miguel Guamán	Muy bien	
7	2014-03-04	93	Ing. Miguel Guamán	OK	
8	2014-03-04	96	Ing. Miguel Guamán	Bien	
9	2014-03-04	98	Ing. Miguel Guamán	Muy bien	
10	2014-03-04	97	Ing. Miguel Guamán	Bien	
11	2014-03-04	97	Ing. Miguel Guamán	Bien	
12	2014-03-04	90	Ing. Miguel Guamán	OK	
13	2014-03-04	93	Ing. Miguel Guamán	OK	
14	2014-03-04	100	Ing. Miguel Guamán	Muy bien	
15	2014-03-04	97	Ing. Miguel Guamán	Bien	
16	2014-03-04	86	Ing. Miguel Guamán	OK	
17	2014-03-04	86	Ing. Miguel Guamán	OK	
18	2014-03-04	100	Ing. Miguel Guamán	Muy bien	
19	2014-03-04	86	Ing. Miguel Guamán	OK	
20	2014-03-04	86	Ing. Miguel Guamán	OK	

Promedio
95
Lim. Inferior
80
Lim. Superior
110
Lim. Acción Inferior
73
Lim acción superior
117

Nueva hoja



CARTAS CONTROL

INGENIERÍA AMBIENTAL

CODIGO: R 5.9.3
REVISION: 0
FECHA: 2011-09-26
Elaborado por:
Patricio Puchaicela
Aprobado por:
Miguel Guamán.

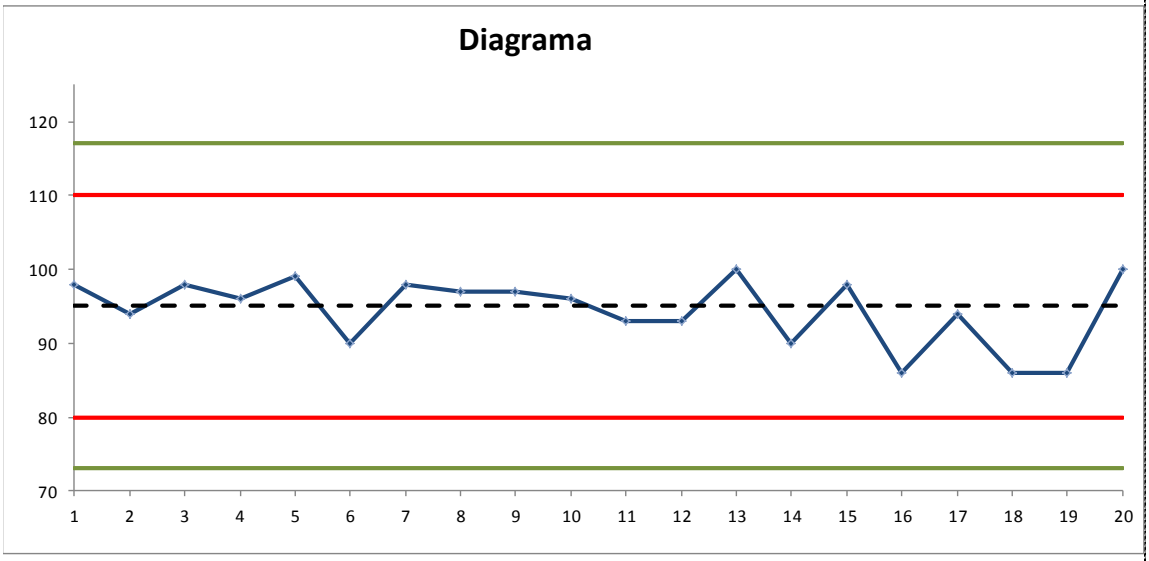
Carta Control R 5.9.3.

MUESTRA CONTROL:	Agua natural
MÉTODO:	Filtracion por membrana
ANÁLISIS	*Escherichia coli*
UNIDAD	% de recuperación

#	Fecha	Resultado	Responsable	Observación	
1	2014-03-04	98	Ing. Miguel Guamán	Muy bien	
2	2014-03-04	94	Ing. Miguel Guamán	OK	
3	2014-03-04	98	Ing. Miguel Guamán	Muy bien	
4	2014-03-04	96	Ing. Miguel Guamán	Bien	
5	2014-03-04	99	Ing. Miguel Guamán	Muy bien	
6	2014-03-04	90	Ing. Miguel Guamán	OK	
7	2014-03-04	98	Ing. Miguel Guamán	Bien	
8	2014-03-04	97	Ing. Miguel Guamán	Bien	
9	2014-03-04	97	Ing. Miguel Guamán	Bien	
10	2014-03-04	96	Ing. Miguel Guamán	Bien	
11	2014-03-04	93	Ing. Miguel Guamán	OK	
12	2014-03-04	93	Ing. Miguel Guamán	OK	
13	2014-03-04	100	Ing. Miguel Guamán	Muy bien	
14	2014-03-04	90	Ing. Miguel Guamán	OK	
15	2014-03-04	98	Ing. Miguel Guamán	Muy bien	
16	2014-03-04	86	Ing. Miguel Guamán	OK	
17	2014-03-04	94	Ing. Miguel Guamán	Bien	
18	2014-03-04	86	Ing. Miguel Guamán	OK	
19	2014-03-04	86	Ing. Miguel Guamán	OK	
20	2014-03-04	100	Ing. Miguel Guamán	Muy bien	

Promedio
95
Lim. Inferior
80
Lim. Superior
110
Lim. Acción Inferior
73
Lim acción superior
117

Nueva hoja



CARTAS CONTROL

INGENIERÍA AMBIENTAL

CODIGO: R 5.9.3
REVISION: 0
FECHA: 2011-09-26
Elaborado por:
Patricio Puchaicela
Aprobado por:
Miguel Guamán.

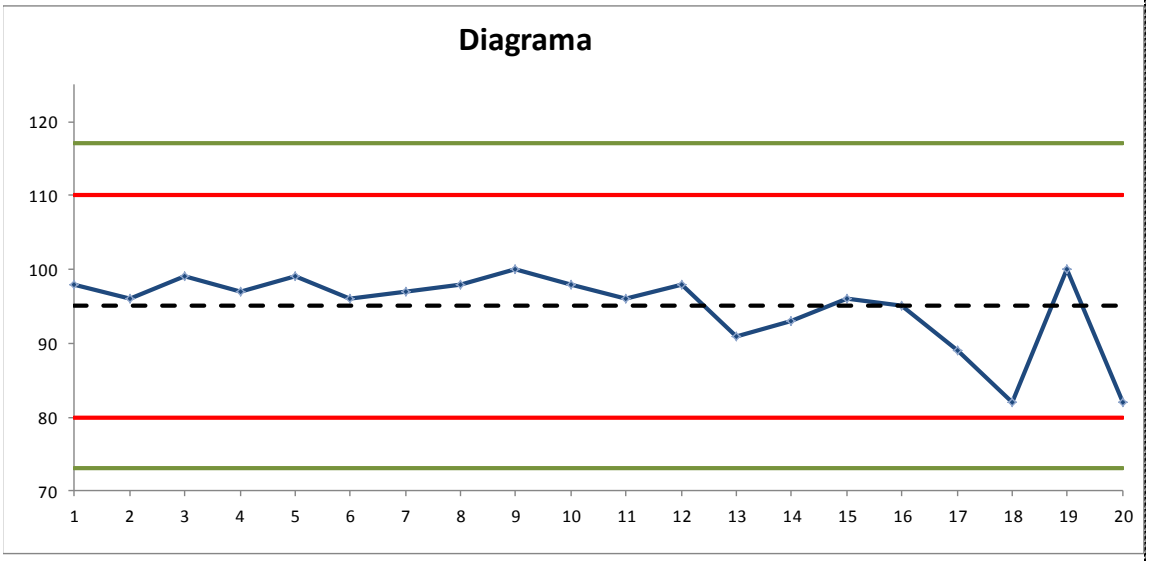
Carta Control R 5.9.3.

MUESTRA CONTROL:	Agua residual
MÉTODO:	Filtracion por membrana
ANÁLISIS	*Escherichia coli*
UNIDAD	% de recuperación

#	Fecha	Resultado	Responsable	Observación	
1	2014-03-04	98	Ing. Miguel Guamán	Muy bien	
2	2014-03-04	96	Ing. Miguel Guamán	Bien	
3	2014-03-04	99	Ing. Miguel Guamán	Muy bien	
4	2014-03-04	97	Ing. Miguel Guamán	Bien	
5	2014-03-04	99	Ing. Miguel Guamán	Muy bien	
6	2014-03-04	96	Ing. Miguel Guamán	Bien	
7	2014-03-04	97	Ing. Miguel Guamán	Bien	
8	2014-03-04	98	Ing. Miguel Guamán	Bien	
9	2014-03-04	100	Ing. Miguel Guamán	Muy bien	
10	2014-03-04	98	Ing. Miguel Guamán	Bien	
11	2014-03-04	96	Ing. Miguel Guamán	Bien	
12	2014-03-04	98	Ing. Miguel Guamán	Bien	
13	2014-03-04	91	Ing. Miguel Guamán	OK	
14	2014-03-04	93	Ing. Miguel Guamán	OK	
15	2014-03-04	96	Ing. Miguel Guamán	Bien	
16	2014-03-04	95	Ing. Miguel Guamán	OK	
17	2014-03-04	89	Ing. Miguel Guamán	OK	
18	2014-03-04	82	Ing. Miguel Guamán	OK	
19	2014-03-04	100	Ing. Miguel Guamán	Muy bien	
20	2014-03-04	82	Ing. Miguel Guamán	Bien	

Promedio
95
Lim. Inferior
80
Lim. Superior
110
Lim. Acción Inferior
73
Lim acción superior
117

Nueva hoja



CARTAS CONTROL

INGENIERÍA AMBIENTAL

CODIGO: R 5.9.3
REVISION: 0
FECHA: 2011-09-26
Elaborado por:
Patricio Puchaicela
Aprobado por:
Miguel Guamán.

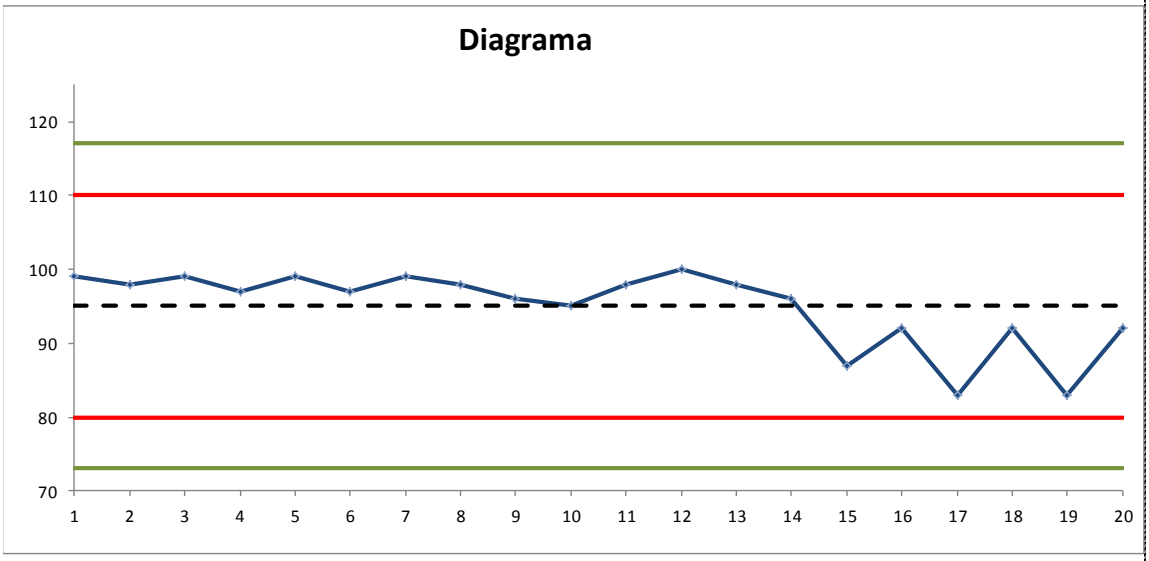
Carta Control R 5.9.3.

MUESTRA CONTROL:	Agua potable
MÉTODO:	Filtracion por membrana
ANÁLISIS	*Pseudomona Aeruginosa*
UNIDAD	% de recuperación

#	Fecha	Resultado	Responsable	Observación	
1	2014-03-04	99	Ing. Miguel Guamán	Muy bien	
2	2014-03-04	98	Ing. Miguel Guamán	Bien	
3	2014-03-04	99	Ing. Miguel Guamán	Muy bien	
4	2014-03-04	97	Ing. Miguel Guamán	Bien	
5	2014-03-04	99	Ing. Miguel Guamán	Muy bien	
6	2014-03-04	97	Ing. Miguel Guamán	Bien	
7	2014-03-04	99	Ing. Miguel Guamán	Muy bien	
8	2014-03-04	98	Ing. Miguel Guamán	Bien	
9	2014-03-04	96	Ing. Miguel Guamán	Bien	
10	2014-03-04	95	Ing. Miguel Guamán	Bien	
11	2014-03-04	98	Ing. Miguel Guamán	Muy bien	
12	2014-03-04	100	Ing. Miguel Guamán	Muy bien	
13	2014-03-04	98	Ing. Miguel Guamán	Muy bien	
14	2014-03-04	96	Ing. Miguel Guamán	Bien	
15	2014-03-04	87	Ing. Miguel Guamán	OK	
16	2014-03-04	92	Ing. Miguel Guamán	OK	
17	2014-03-04	83	Ing. Miguel Guamán	OK	
18	2014-03-04	92	Ing. Miguel Guamán	OK	
19	2014-03-04	83	Ing. Miguel Guamán	OK	
20	2014-03-04	92	Ing. Miguel Guamán	OK	

Promedio
95
Lim. Inferior
80
Lim. Superior
110
Lim. Acción Inferior
73
Lim acción superior
117

Nueva hoja



CARTAS CONTROL

INGENIERÍA AMBIENTAL

CODIGO: R 5.9.3
REVISION: 0
FECHA: 2011-09-26
Elaborado por:
Patricio Puchaicela
Aprobado por:
Miguel Guamán.

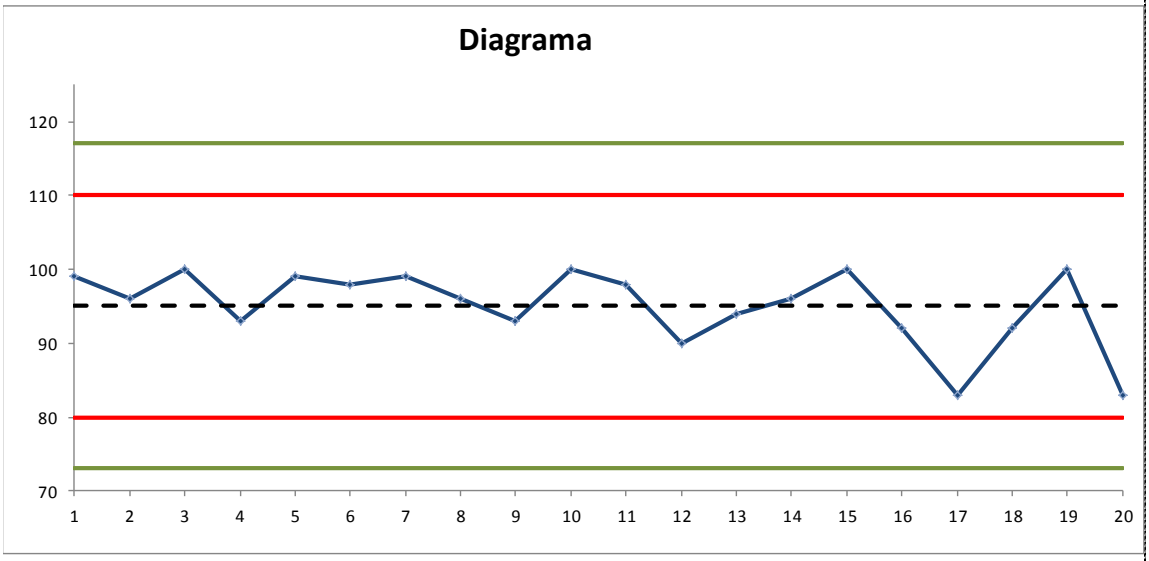
Carta Control R 5.9.3.

MUESTRA CONTROL:	Agua natural
MÉTODO:	Filtracion por membrana
ANÁLISIS	*Pseudomona Aeruginosa*
UNIDAD	% de recuperación

#	Fecha	Resultado	Responsable	Observación	
1	2014-03-04	99	Ing. Miguel Guamán	Muy bien	
2	2014-03-04	96	Ing. Miguel Guamán	Bien	
3	2014-03-04	100	Ing. Miguel Guamán	Muy bien	
4	2014-03-04	93	Ing. Miguel Guamán	Bien	
5	2014-03-04	99	Ing. Miguel Guamán	Muy bien	
6	2014-03-04	98	Ing. Miguel Guamán	Bien	
7	2014-03-04	99	Ing. Miguel Guamán	Muy bien	
8	2014-03-04	96	Ing. Miguel Guamán	Bien	
9	2014-03-04	93	Ing. Miguel Guamán	OK	
10	2014-03-04	100	Ing. Miguel Guamán	Muy bien	
11	2014-03-04	98	Ing. Miguel Guamán	Muy bien	
12	2014-03-04	90	Ing. Miguel Guamán	OK	
13	2014-03-04	94	Ing. Miguel Guamán	OK	
14	2014-03-04	96	Ing. Miguel Guamán	Bien	
15	2014-03-04	100	Ing. Miguel Guamán	Muy bien	
16	2014-03-04	92	Ing. Miguel Guamán	OK	
17	2014-03-04	83	Ing. Miguel Guamán	OK	
18	2014-03-04	92	Ing. Miguel Guamán	OK	
19	2014-03-04	100	Ing. Miguel Guamán	Muy bien	
20	2014-03-04	83	Ing. Miguel Guamán	OK	

Promedio
95
Lim. Inferior
80
Lim. Superior
110
Lim. Acción Inferior
73
Lim acción superior
117

Nueva hoja



DOCUMENTO CONTROLADO Y CONFIDENCIAL

CARTAS CONTROL

INGENIERÍA AMBIENTAL

CODIGO: R 5.9.3
REVISION: 0
FECHA: 2011-09-26
Elaborado por:
Patricio Puchaicela
Aprobado por:
Miguel Guamán.

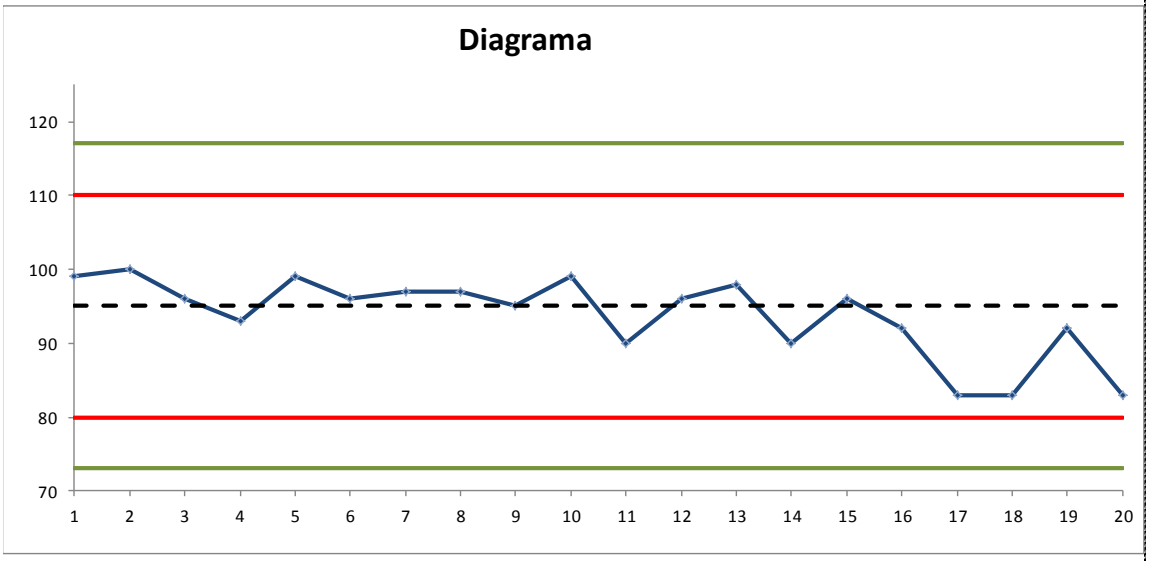
Carta Control R 5.9.3.

MUESTRA CONTROL:	Agua residual
MÉTODO:	Filtracion por membrana
ANÁLISIS	*Pseudomona Aeruginosa*
UNIDAD	% de recuperación

#	Fecha	Resultado	Responsable	Observación	
1	2014-03-04	99	Ing. Miguel Guamán	Muy bien	
2	2014-03-04	100	Ing. Miguel Guamán	Muy bien	
3	2014-03-04	96	Ing. Miguel Guamán	Bien	
4	2014-03-04	93	Ing. Miguel Guamán	OK	
5	2014-03-04	99	Ing. Miguel Guamán	Muy bien	
6	2014-03-04	96	Ing. Miguel Guamán	Bien	
7	2014-03-04	97	Ing. Miguel Guamán	Bien	
8	2014-03-04	97	Ing. Miguel Guamán	Bien	
9	2014-03-04	95	Ing. Miguel Guamán	Bien	
10	2014-03-04	99	Ing. Miguel Guamán	Muy bien	
11	2014-03-04	90	Ing. Miguel Guamán	OK	
12	2014-03-04	96	Ing. Miguel Guamán	Bien	
13	2014-03-04	98	Ing. Miguel Guamán	Muy bien	
14	2014-03-04	90	Ing. Miguel Guamán	OK	
15	2014-03-04	96	Ing. Miguel Guamán	Muy bien	
16	2014-03-04	92	Ing. Miguel Guamán	OK	
17	2014-03-04	83	Ing. Miguel Guamán	OK	
18	2014-03-04	83	Ing. Miguel Guamán	OK	
19	2014-03-04	92	Ing. Miguel Guamán	Bien	
20	2014-03-04	83	Ing. Miguel Guamán	OK	

Promedio
95
Lim. Inferior
80
Lim. Superior
110
Lim. Acción Inferior
73
Lim acción superior
117

Nueva hoja



ANEXO III

CERTIFICADOS DE CALIDAD

Microbiologics®

Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications
Microorganism Name: Escherichia coli
Catalog Number: 0335
Lot Number: 335-107
Reference Number: ATCC® 25922™*
Purity: < 0.1% Total Pellet CFU
Recovery: > 1000 CFUs per Pellet
Passage from Reference: 4

Expiration Date: 2014/08
Release Information:
Quality Control Technologist: Christine Condon
Release Date: 2012/9/10

Performance

Macroscopic Features:
2 colony types, both are gray & beta hemolytic: one is circular to irregular, convex, slightly erose edge & smooth; other is larger, irregular, low convex, erose edge & rough

Medium:
SBAP

Microscopic Features:
Gram negative straight rod

Method:
Gram Stain (1)

Vitek GN (1)

Phenotypic Features	Results
Ala-Phe-Pro-ARYLAMIDASE	-
ADONITOL	-
L-Pyrrolydonyl-ARYLAMIDASE	-
L-ARABITOL	-
D-CELLOBIOSE	-
BETA-GALACTOSIDASE	+
H2S PRODUCTION	-
BETA-N-ACETYL-GLUCOSAMINIDASE	-
Glutamyl Arylamidase pNA	-
D-GLUCOSE	+
GAMMA-GLUTAMYL-TRANSFERASE	-
FERMENTATION/GLUCOSE	+
BETA-GLUCOSIDASE	-
D-MALTOSE	+
D-MANNITOL	+
D-MANNOSE	+
BETA-XYLOSIDASE	-
BETA-Alanine arylamidase pNA	-
L-Proline ARYLAMIDASE	-
LIPASE	-
PALATINOSE	-
Tyrosine ARYLAMIDASE	+
UREASE	-
D-SORBITOL	+
SACCHAROSE/SUCROSE	-
D-TAGATOSE	-
D-TREHALOSE	+
CITRATE (SODIUM)	-
MALONATE	-
5-KETO-D-GLUCONATE	-
L-LACTATE alkalinization	+
ALPHA-GLUCOSIDASE	-
SUCCINATE alkalinization	+
BETA-N-ACETYL-GALACTOSAMINIDASE	-
ALPHA-GALACTOSIDASE	+
PHOSPHATASE	+
Glycine ARYLAMIDASE	-
ORNITHINE DECARBOXYLASE	+
LYSINE DECARBOXYLASE	+
L-HISTIDINE assimilation	-
COURMARATE	+
BETA-GLUCORONIDASE	+
O/129 RESISTANCE (comp.vibrio.)	-
Glu-Gly-Arg-ARYLAMIDASE	-
L-MALATE assimilation	-
ELLMAN	+
L-LACTATE assimilation	-

Other Features/ Challenges: Results
(1) Oxidase(Kovacs): negative
Beta-glucuronidase (E. coli Broth w/MUG): positive
(1) Ampicillin (10 mcg - Disk Susceptibility): 16 - 22 mm
(1) Gentamicin (10 mcg - Disk Susceptibility): 19 - 26 mm
(1) SXT (1.25/23.75 mcg - Disk Susceptibility): 23 - 29 mm

MEDIBA INC S.A.
Distribuidor para el Ecuador de
MICROBIOLOGICS
Registro Sanitario AD-541.04-13

Brad Goskowicz, President
AUTHORIZED SIGNATURE

© 2012 Microbiologics, Inc. All Rights Reserved. 200 Cooper Avenue North Saint Cloud, MN 56303

Microbiologics®

Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications	Expiration Date: 2014/08
Microorganism Name: Escherichia coli	**Release Information:**
Catalog Number: 0335	**Quality Control Technologist:** Christine Condon
Lot Number: 335-107	**Release Date:** 2012/9/10
Reference Number: ATCC® 25922™*	
Purity: < 0.1% Total Pellet CFU	
Recovery: > 1000 CFUs per Pellet	
Passage from Reference: 4	

Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the packing slip is merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.

Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.

⚠ **Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.**

Individual products are traceable to a recognized culture collection.

ATCC Licensed Derivative

(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.

(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.

ACCREDITED

TESTING CERT #2655.01

© 2012 Microbiologics, Inc. All Rights Reserved. 200 Cooper Avenue North Saint Cloud, MN 56303

Microbiologics®

Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications	
Microorganism Name: Pseudomonas aeruginosa	**Expiration Date:** 2014/07
Catalog Number: 0353	**Release Information:**
Lot Number: 353-127	**Quality Control Technologist:** Megan Murn
Reference Number: ATCC® 27853™*	**Release Date:** 2012/8/23
Purity: < 0.1% Total Pellet CFU	
Recovery: > 1000 CFUs per Pellet	
Passage from Reference: 4	

Performance

Macroscopic Features:	Medium:
Two colony types: Large, flat, circular to irregular shaped, gray with silver sheen(98%); And small and compact	SBAP
Microscopic Features:	**Method:**
Straight or slightly curved gram negative rod	Gram Stain (1)

Vitek GN

Phenotypic Features	Results
Ala-Phe-Pro-ARYLAMIDASE	+
ADONITOL	-
L-Pyrrolydonyl-ARYLAMIDASE	-
L-ARABITOL	-
D-CELLOBIOSE	-
BETA-GALACTOSIDASE	-
H2S PRODUCTION	-
BETA-N-ACETYL-GLUCOSAMINIDASE	-
Glutamyl Arylamidase pNA	-
D-GLUCOSE	+
GAMMA-GLUTAMYL-TRANSFERASE	+
FERMENTATION/GLUCOSE	-
BETA-GLUCOSIDASE	-
D-MALTOSE	-
D-MANNITOL	+
D-MANNOSE	+
BETA-XYLOSIDASE	-
BETA-Alanine arylamidase pNA	+
L-Proline ARYLAMIDASE	+
LIPASE	+
PALATINOSE	-
Tyrosine ARYLAMIDASE	+
UREASE	-
D-SORBITOL	-
SACCHAROSE/SUCROSE	-
D-TAGATOSE	-
D-TREHALOSE	-
CITRATE (SODIUM)	+
MALONATE	+
5-KETO-D-GLUCONATE	-
L-LACTATE alkalinization	+
ALPHA-GLUCOSIDASE	-
SUCCINATE alkalinization	+
BETA-N-ACETYL-GALACTOSAMINIDASE	-
ALPHA-GALACTOSIDASE	-
PHOSPHATASE	+
Glycine ARYLAMIDASE	-
ORNITHINE DECARBOXYLASE	-
LYSINE DECARBOXYLASE	-
L-HISTIDINE assimilation	-
COURMARATE	+
BETA-GLUCORONIDASE	-
O/129 RESISTANCE (comp.vibrio.)	+
Glu-Gly-Arg-ARYLAMIDASE	-
L-MALATE assimilation	+
ELLMAN	-
L-LACTATE assimilation	-

Other Features/ Challenges: Results

(1) Oxidase (Kovacs): positive
(1) Motility B Medium: positive
(1) Gentamicin (10 mcg - Disk Susceptibility)

MEDIB[illegible] INC S.A.
Distribuidor [illegible] Ecuador de
M[illegible] GICS
Registro Sanit[illegible] A[illegible] 541-04-13

Brad Goskowicz, President
AUTHORIZED SIGNATURE

© 2012 Microbiologics, Inc. All Rights Reserved. 200 Cooper Avenue North Saint Cloud, MN 56303

Microbiologics®

Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications	
Microorganism Name: Pseudomonas aeruginosa **Catalog Number:** 0353 **Lot Number:** 353-127 **Reference Number:** ATCC® 27853™* **Purity:** < 0.1% Total Pellet CFU **Recovery:** > 1000 CFUs per Pellet **Passage from Reference:** 4	**Expiration Date:** 2014/07 **Release Information:** **Quality Control Technologist:** Megan Murn **Release Date:** 2012/8/23

Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the packing slip is merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.

Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.

Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.

Individual products are traceable to a recognized culture collection.

ATCC Licensed Derivative®

(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.

(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.

ACCREDITED

TESTING CERT #2655.01

© 2012 Microbiologics, Inc. All Rights Reserved. 200 Cooper Avenue North Saint Cloud, MN 56303

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Millipore certifies that the m-ColiBlue24® Broth (Catalog# M00PMCB24) is ready to use and manufactured for the analysis of coliform and *E. coli* bacteria in water and wastewater using the membrane filtration procedures in the references listed below. Representative samples from this lot meet the following specifications.

Volume: 1.8-2.0ml per ampoule
Recovery: 80-120% of m-Endo broth using: *Enterobacter cloacae* ATCC# 23355, *Escherichia coli* ATCC# 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC# 13883 and poor or no growth of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC# 27853
pH @ 25° C: 7.0 ±0.2
Sterility: No growth
Shelf life: 1 year (2-8°C)

References:

Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater APHA 19th Edition, 1995 or Current Edition

Microbiological Methods for Monitoring the Environment. Water and Wastes EPA-600/8-78-017. December 1978

27499-89 02/00

Certificate of Quality

Product Description (MHA000P2E)

2 mL plastic ampoules containing m-Endo Total Coliform Broth.

Composition of the Medium

Formula in grams per liter of purified water:

Tryptose	10.0 g	Monopotassium Phosphate	1.375 g
Peptic Digest of Animal Tissue	5.0 g	Sodium Lauryl Sulfate	0.05 g
Pancreatic Digest of Casein	5.0 g	Sodium Desoxycholate	0.1 g
Yeast Extract	1.5 g	Sodium Sulfite	2.1 g
Lactose	12.5 g	Basic Fuchsin	1.05 g
Sodium Chloride	5.0 g	Ethanol 95°	20.0 mL
Dipotassium Phosphate	4.375 g		

This medium is recommended for Total coliform detection. Lactose fermenting bacteria produce acetaldehyde that reacts with the sodium sulfite and fuchsin to form red colonies. The development of a metallic sheen occurs when the organism produces aldehydes with the rapid fermentation of lactose. If the innoculum is too heavy, the sheen will be suppressed. Storage conditions: 2–10°C

Quality Assurance Lot Release Criteria

This manufacturing lot was sampled, tested and released according to the following specifications:

100 % Inspection

Visual control of appearance, integrity and media level of each ampoule.

Statistical Controls

• Packaging integrity • Conformity of labelling and packaging • Integrity test.

Biological Tests

Bioburden

Representative samples were subjected to bioburden testing. A direct inoculation method is used.

Fertility / Growth Promotion

Fertility tests were conducted using the membrane filtration method.
All the samples provided good growth and typical colony morphology.

Lot Analysis

This product was designed and manufactured to meet the following specifications.

Criteria	Specification	Results
Appearance of the media	Pink to light purple with slight precipitate	Conforms
pH	7.2 ± 0.2	Conforms
Volume of medium	Min:1.8 mL, Max:2.2 mL	Conforms
Bioburden	No growth after 24 hours of incubation at 35°C	Conforms
Growth promotion test:		
Escherichia coli ATCC® 25922	Recovery 85-115% Growth with green metallic sheen	Conforms
Mixed culture (E.coli, Ps aeruginosa, and Pr. vulgaris)	Recovery 85-115% *E.coli* (growth with green metallic sheen), other organisms inhibited	Conforms Conforms

According to the above results, the product complies with Millipore's acceptance criteria and is released.

Paul Nowick
Director, Corporate Supplier Quality

Lot A2354

P90077 Rev A 01/06 05-181

Millipore is a registered trademark of Millipore Corporation.
ATCC is a registered trademark of American Type Culture Collection.

MILLIPORE

Certificate of Quality

Product Description (MHA000P2P)

2 mL plastic ampoules containing Pseudomonas Selective Broth.

Composition of the Medium

Formula in grams per liter of purified water:

Gelatin Peptone	16.0 g	Glycerin	10.0 mL
Casein hydrolysate	10.0 g	CFC Supplement, Oxoid SR 103E	
Potassium sulfate	10.0 g	Ethanol (95%, non denatured)	4.0 mL
Magnesium cloride	1.40 g		

This selective medium is for Pseudomonas.Storage conditions: 2 – 10°C

Quality Assurance Lot Release Criteria

This manufacturing lot was sampled, tested and released according to the following specifications:

100 % Inspection

Visual control of appearance, integrity and media level of each ampoule.

Statistical Controls

• Packaging integrity • Conformity of labelling and packaging • Integrity test.

Biological Tests

Bioburden

Representative samples were subjected to bioburden testing. A direct inoculation method is used.

Fertility / Growth Promotion

Fertility tests were conducted using the membrane filtration method.
All the samples provided good growth and typical colony morphology.

Lot Analysis

This product was designed and manufactured to meet the following specifications.

Criteria	Specification	Results
Appearance of the media	Light amber, clear	Conforms
pH	7.1 ± 0.2	Conforms
Volume of medium	Min: 1.8 mL, Max: 2.2 mL	Conforms
Bioburden	No growth after 2 days of incubation at 35°C	Conforms
Growth promotion test: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853	Recovery 85-115%	Conforms

According to the above results, the product complies with Millipore's acceptance criteria and is released.

Lot A2349

Paul Nowick
Director, Corporate Supplier Quality

P90089 Rev. A 09/05 05-181

Millipore is a registered trademark of Millipore Corporation.
ATCC is a registered trademark of American Type Culture Collection.

MILLIPORE

Certificate of Quality

Product Description (MHA000P2F)

2 mL plastic ampoules containing m-FC with Rosolic Acid Broth.

Composition of the Medium

Formula in grams per liter of purified water:

Bacsate Peptone	10.0 g	Bile Salts	1.5 g
Polypeptone Peptone	5.0 g	Aniline Blue	0.1 g
Yeast Extract	3.0 g	Rosolic Acid	0.1 g
Lactose	12.5 g	Sodium Hydroxide	0.67 g
Sodium Chloride	5.0 g		

This medium is recommended for testing waste and effluent waters for growth of fecal coliforms. Bile salts No 3 inhibits growth of gram positive bacteria. Normally, few non fecal coliform colonies will be observed on m-FC medium because of the elevated temperature and addition of Rosolic acid salt reagent. Storage conditions: 2-10°C

Quality Assurance Lot Release Criteria

This manufacturing lot was sampled, tested and released according to the following specifications:

100 % Inspection

Visual control of appearance, integrity and media level of each ampoule.

Statistical Controls

• Packaging integrity • Conformity of labelling and packaging • Integrity test.

Biological Tests

Bioburden

Representative samples were subjected to bioburden testing. A direct inoculation method is used.

Fertility / Growth Promotion

Fertility tests were conducted using the membrane method.

All the samples provided good growth and typical colony morphology.

Lot Analysis

This product was designed and manufactured to meet the following specifications.

Criteria	Specification	Results
Appearance of the media	Dark Blue, Purple	Conforms
pH	7.4 ± 0.2	Conforms
Volume of medium	Min:1.8 mL, Max:2.2 mL	Conforms
Bioburden	No growth after 24 hours of incubation at 35°C	Conforms
Growth promotion test:		
Escherichia coli ATCC® 25922	Recovery 85-115% Growth with blue colonies	Conforms
Mixed culture (*E.coli*, *Ps aeruginosa*, and *Pr. vulgaris*)	Recovery 85-115% *E.coli* (growth with blue colonies), other organisms inhibited	Conforms

According to the above results, the product complies with Millipore's acceptance criteria and is released.

Paul Nowick
Director, Corporate Supplier Quality

Lot A3049

P90078 Rev. A 01/07 05-8

Millipore is a registered trademark of Millipore Corporation.
ATCC is a registered trademark of American Type Culture Collection.

MILLIPORE