

Implementación de un tren de filtración al vacío para mejorar la eficiencia y optimización del proceso de filtración por membrana en la identificación de Coliformes totales y *Escherichia coli* presentes en agua potable

Karen Yiseth Moreno Murillo

Director (a)
Sandra Lorena Realpe Lopera
Director (a)
MSc Carlos Andrés Aranaga Arias

Universidad Santiago de Cali
Facultad de Ciencias Básicas
Programa de Microbiología
Cali, Colombia 2024

Implementación de un tren de filtración al vacío para mejorar la eficiencia y optimización del proceso de filtración por membrana en la identificación de Coliformes totales y *Escherichia coli* presentes en agua potable

Karen Yiseth Moreno Murillo

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de:
Microbiólogo**

**Director (a)
Sandra Lorena Realpe Lopera
Director (a)
MSc. Carlos Andrés Aranaga Arias**

**Línea de Investigación:
Investigación e innovación en patologías tropicales
Grupo de Investigación:
QUIBIO**

**Universidad Santiago de Cali
Facultad de Ciencias Básicas
Programa de Microbiología
Cali, Colombia 2024**

IMPACTOS

Relacione el (los) impacto(s) que presentó el Trabajo de Grado

IMPACTO	PRODUCTO	BENEFICIARIO(S)
Económico	La implementación de un tren de filtración permite la reducción en el tiempo de procesamiento de las muestras y disminuye los costos operativos	Laboratorio AGUAQUIM SAS, Jamundí
Científico	Trabajo de grado para la obtención del título de Microbiología	Karen Yiseth Moreno Murillo

IMPLEMENTACIÓN DE UN TREN DE FILTRACIÓN AL VACÍO PARA MEJORAR LA EFICIENCIA Y
OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE FILTRACIÓN POR MEMBRANA EN LA IDENTIFICACIÓN DE
COLIFORMES TOTALES Y *Escherichia coli* PRESENTES EN AGUA POTABLE

Karen Yiseth Moreno Murillo ¹, Carlos Andrés Aranaga Arias ², Sandra Lorena Realpes Lopera ³

¹ Estudiante del programa de microbiología. Facultad de Ciencias Básicas. Universidad Santiago de Cali.
Campus Pampalinda Calle 5 #62-00. Santiago de Cali, Colombia

² Grupo de investigación QUIBIO, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad Santiago de Cali, Campus
Pampalinda Calle 5 #62-00. Santiago de Cali, Colombia.

³ Directora técnica del laboratorio, AGUAQUIM LABORATORIO SAS Carrera 21B #8sur-16, Jamundí Valle del
Cauca.

RESUMEN

Este estudio abordó la optimización del análisis microbiológico de agua potable mediante la implementación de un tren de vacío para filtración por membrana. Se planteaba que esta técnica mejora la detección de coliformes totales y *Escherichia coli* esenciales para evaluar la seguridad del agua. La metodología incluyó pruebas de selectividad, esterilidad y eficiencia en medios de cultivo Chromocult y PCA, así como la estandarización del método de filtración con validación a través de cepas control. Los resultados obtenidos demostraron que no existían diferencias estadísticamente significativas entre el sistema de filtración convencional y el tren de filtración ya que en los resultados de los análisis de varianza se alcanzó un valor del F calculado de 0.04 para la prueba de reproducibilidad del método utilizado por dos analistas diferentes, así mismo para la prueba de reproducibilidad utilizando los dos sistemas de filtración bajo las mismas condiciones, se obtuvo un valor del F calculado de 0.45, por lo tanto se puede concluir que la implementación del tren de filtración es eficaz y muestra concordancia con los resultados en comparación con el sistema de filtración convencional, y puede ser operado por dos analistas diferentes bajo las mismas condiciones.

Palabras clave: Filtración por membrana; *Escherichia coli*; Validación

IMPLEMENTATION OF A VACUUM FILTRATION TRAIN TO IMPROVE THE EFFICIENCY AND
OPTIMIZATION OF THE MEMBRANE FILTRATION PROCESS IN THE IDENTIFICATION OF TOTAL
COLIFORMS AND *Escherichia coli* PRESENT IN DRINKING WATER

ABSTRACT

This study addresses the optimization of the microbiological analysis of drinking water through the implementation of a vacuum train for membrane filtration. It was proposed that this technique improves the detection of total coliforms and *Escherichia coli* essential to evaluate water safety. The methodology included tests of selectivity, sterility and efficiency in Chromocult and PCA culture media, as well as the standardization of the filtration method with validation through control strains. The results obtained showed that there were no statistically significant differences between the conventional filtration system and the filtration train since in the results of the variance analysis a calculated F value of 0.04 was reached for the reproducibility test of the method used by two different analysts, as well as for the reproducibility test using the two filtration systems under the same conditions, a calculated F value of 0.45 was obtained, therefore it can be concluded that the implementation of the filtration train is effective and shows agreement with the results in Comparison with the conventional filtration system, and can be operated by two analysts Different under the same conditions.

Keywords: *Membrane filtration; Escherichia coli, Validation*

1. INTRODUCCIÓN

La calidad del agua potable es un tema de vital importancia debido a su papel esencial en la vida humana. La presencia de microorganismos patógenos, como bacterias, virus y protozoos, así como de contaminantes químicos, puede representar un riesgo significativo para la salud si se encuentran en concentraciones elevadas [1]. Los análisis de calidad del agua potable son fundamentales para asegurar que ésta cumpla con los estándares regulatorios y para identificar cualquier contaminación que pueda representar un riesgo para la salud pública. El monitoreo constante de la calidad del agua es crucial para prevenir brotes de enfermedades transmitidas por el agua y garantizar un suministro seguro y confiable para la población [2].

Durante el proceso de suministro de agua, surgen oportunidades para la entrada y proliferación de microorganismos desde múltiples fuentes, como cámaras de bombeo, tanques de distribución y reparaciones en tuberías. Sin embargo, el problema más crítico radica en la contaminación con materia fecal. Las tuberías pueden albergar sedimentos y heces, proporcionando un ambiente ideal para el crecimiento de microorganismos [1]. Un análisis eficiente y preciso del agua potable es crucial para asegurar que ésta cumple con los estándares de calidad y seguridad, además de contribuir a la identificación temprana de problemas en la fuente de suministro y en el sistema de distribución. Esto permite tomar medidas preventivas y correctivas oportunas [3].

La preocupación principal es la salud pública, ya que la ingestión de agua contaminada con patógenos puede desencadenar enfermedades entéricas que afectan el sistema gastrointestinal humano. Los microorganismos causantes de estas afecciones son expulsados en las heces y, en situaciones de mala higiene y saneamiento, el contacto directo con la materia fecal puede resultar en infecciones graves [4].

En los laboratorios de control de calidad, una de las técnicas más eficaces para determinar la presencia de coliformes fecales y totales es el método de filtración por membrana [11]. Este método permite obtener resultados altamente confiables mediante el análisis de grandes volúmenes de muestras. El proceso consiste en pasar una muestra a través de un filtro de membrana con poros de 0,45 μm , donde las bacterias quedan retenidas [5].

Existen diversos equipos para realizar la filtración por membrana, los cuales optimizan los tiempos de operación según el número de muestras que se requieran analizar. Entre ellos, el uso de un tren de vacío para la filtración por membrana es especialmente relevante en áreas donde la calidad del agua potable es una preocupación constante [12]. Este enfoque no solo aumenta la sensibilidad en la detección de microorganismos patógenos, sino que también reduce el tiempo necesario para obtener resultados, lo cual es vital en situaciones de emergencia [6].

La validación de un método es fundamental para asegurar la fiabilidad y reproducibilidad de los resultados obtenidos. Las validaciones se basan en estándares y normativas nacionales e internacionales, las cuales garantizan la calidad de los métodos de ensayo [7]. La norma internacional ISO 17025 establece los requisitos generales para respaldar un sistema de gestión de calidad efectivo, asegurando que los procedimientos llevados a cabo en este estudio sean realizados de manera confiable y consistente [8].

En esta investigación, se realizó la implementación de un tren de filtración al vacío para mejorar la eficiencia y optimización del proceso de filtración por membrana para una empresa dedicada entre otros al análisis microbiológico de agua potable y de recreación [6].

2. MATERIALES Y METODOS

Para llevar a cabo el estudio del análisis de la calidad del agua potable se utilizó un nuevo sistema de tren de vacío para filtración por membrana y un sistema ya utilizado de vacío de un solo embudo con fines microbiológicos, para validar el método y comparar los dos sistemas utilizados en el laboratorio, se realizó la siguiente metodología:

2.1. Ubicación del estudio

El estudio de la validación de método para filtración por membrana utilizando un tren de filtración al vacío de tres puestos y un sistema de filtración de un solo puesto para el análisis de agua potable, fue llevado a cabo en un laboratorio del sector dedicado a el análisis microbiológico y fisicoquímico del agua potable y uso recreacional en las ciudades de Cali, Jamundí y Palmira.

2.2. Control de ambientes

Para el control de ambientes se utilizó el método de sedimentación en placa, el cual consistió en abrir una caja Petri durante 20 minutos en diferentes puntos del laboratorio de microbiología, las cajas contenían agar PCA para lograr la proliferación de microorganismos aerobios mesófilos, y otra caja con agar Sabouraud para la proliferación de hongos, mohos y levaduras. Pasados el tiempo, las cajas fueron cerradas y llevadas a incubación, para las cajas con PCA las condiciones de incubación fueron las siguientes: 35°C por 48 horas, mientras que las cajas que contenían el agar Sabouraud fueron incubadas a temperatura ambiente durante 5 días.

2.3. Control de calidad de los medios de cultivo

Se utilizaron los siguientes medios de cultivo: Agar Chromocult (Merk agar para coliformes 110426) para la identificación de bacterias coliformes (Totales y *Escherichia coli*), Agar Plate Count (Agar para métodos estándar (PCA) ISO/APHA), Tripticasa de Soja Agar (TSA) Tripticasa de Soja Caldo (TSB por sus siglas en ingles) para la reactivación de las cepas, y agua desmineralizada.

Para determinar la esterilidad del medio, estos se prepararon de acuerdo a las indicaciones dadas por la casa comercial, los medios previamente preparados fueron servidos en cajas Petri y llevados a incubación por 48 horas a 37°C, para el medio Chromocult se debe resaltar que este medio no fue esterilizado en la autoclave porque su casa comercial indica que este medio no es apto para autoclave [13], por lo tanto después de haber sido preparado y calentado, se sirvió en las cajas Petri estériles y fue llevado a incubación por los tiempos y temperaturas ya mencionados en donde una vez pasado el tiempo de incubación deberían dar un resultado de esterilidad positivo, es decir, no puede haber crecimiento bacteriano [9].

2.4. Control de calidad de la autoclave

El proceso de control de calidad de la autoclave fue realizado con el fin de garantizar que el equipo funcionara y esterilizara adecuadamente los materiales a utilizar en la validación, este control se realizó de la siguiente manera: para ello se empleó un control biológico utilizando ampollas de vidrio de Sterikon® Plus Bioindicator, distribuidas por la casa comercial Merck, este indicador fue puesto en la parte central de la autoclave para que el vapor no lograra alcanzarla, una vez ubicado en la autoclave, se inició con el ciclo de esterilización empleado normalmente en el laboratorio [10]

Pasado el tiempo de esterilización, se retiró el indicador de la autoclave y fue llevado a incubación a 35°C durante 48 horas. Una vez pasado el tiempo, se realizó la lectura de los resultados.

2.5. Reactivación de la cepa y estandarización del inóculo

- **Reactivación de las cepas bacterianas**

A partir de una punción de medio TSA de cada una de las cepas, se tomó una porción de agar, se agregó en 1mL de medio TSB y se llevó a incubación por 37°C durante 48 horas. Una vez pasado el tiempo de incubación, se sembró por agotamiento en TSA hasta observar el crecimiento.

- **Estandarización del inóculo**

Una vez se observó el crecimiento de las cepas de referencia en TSA, se procedió a estandarizar el inóculo de la siguiente manera: En un frasco estéril que contenía 30mL de agua peptonada, se realizó una suspensión bacteriana de cada una de las cepas de trabajo hasta alcanzar una absorbancia en el espectrofotómetro a 600nm de 0,3.

Una vez determinada la turbidez, se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-7} partiendo de 1mL de la suspensión bacteriana previamente realizada en tubos de ensayo que contenían 9mL de agua peptonada. Posteriormente se procedió a sembrar 10 μ L de las diluciones 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} por triplicado para observar su crecimiento y determinar la concentración de trabajo.

2.6. Pruebas de selectividad y productividad

- **Prueba semicuantitativa: Método ecométrico**

Para esta prueba se seleccionó la cepa de referencia de *Escherichia coli* ATCC 25923 y como cepa interferente *Staphylococcus aureus* ATCC 6438. Cada cepa se sembró por triplicado en medio de cultivo Crhomocult y PCA de la siguiente manera: la caja Petri fue dividida en cuatro cuadrantes, con la ayuda de un asa estéril calibrada a 10 μ L en cada cuadrante se realizaron 5 estrías paralelas y una estría central sin retomar la muestra sobre la superficie del medio de cultivo [14]. En la figura 1 se puede observar cómo fue realizada la técnica

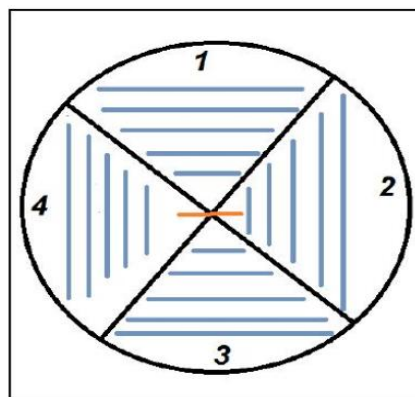


Figura 1. Demostración Gráfica del Método Ecométrico

Una vez listas, las cajas fueron llevadas a incubación a 37°C por 48 horas. Pasado el tiempo de incubación se procedió a realizar la evaluación del índice de crecimiento absoluto (ICA) en donde a cada estría que tuvo un crecimiento más del 25% se le asignó un valor de 0.2 mientras que a la estría central se le asignó un valor de 1 cuando se observaba crecimiento, sino se observaba un crecimiento se tomaba como 0, posterior a esto, para obtener el ICA se deben sumar todos los valores calculados en cada uno de los cuadrantes. En la tabla 1 se muestran los criterios de evaluación del ICA.

Tabla 1. Criterios de evaluación del ICA

ICA	PRODUCTIVIDAD
>2,5	bajamente productivo
≥2,5-4.0	medianamente productivo
>4,0	altamente productivo

- **Prueba Cuantitativa**

Para esta prueba se procedió a realizar una suspensión bacteriana en 30mL de agua peptonada la cual fue ajustada a una concentración de 3×10^8 UFC/mL para cada una de las cepas, para efectuar un control negativo y positivo del crecimiento en los medios Chromocult y PCA. Una vez lista la suspensión se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-7} de cada una de las cepas y se procedió a sembrar por superficie 100μL de la dilución 10^{-7} de *E. coli* y *S. aureus* en Chromocult como medio de cultivo experimental y 100μL en PCA como medio de referencia, este procedimiento se hizo por triplicado para una mejor comparación. Una vez lista la siembra por superficie las cajas Petri fueron llevadas a incubación a 37°C por 48 horas.

Pasado el tiempo de incubación se procedió a determinar la proporción de la productividad de los medios, de la siguiente manera:

$$P: \frac{Nc \text{ chr}}{Nc \text{ PCA}} \times 100$$

Donde

Nc Chr = es el número de colonias obtenidas en Chromocult

Nc PCA = es el número de colonias obtenidas en PCA

- **Prueba Cualitativa**

Esta comparación se hizo de manera visual en donde a cada prueba se le evaluó un score de cero a dos del crecimiento en el medio de cultivo en donde dos determina un buen crecimiento y cero cuando no hubo crecimiento.

2.7. Implementación de un tren de filtración de tres puestos como medio para optimizar el tiempo y la eficacia en los resultados de la filtración por membrana

Este proceso se hizo con el fin de optimizar el tiempo y la eficiencia del proceso de filtración por membrana en el laboratorio, ya que utilizar trenes de dos o mas puestos a la hora de filtrar resulta ser un diseño útil en laboratorios donde se requieran análisis paralelos de varias muestras.

El sistema se compone de: tres embudos de filtración, un soporte sostener los tres embudos de manera segura y estable, bomba de vacío para aplicar presión negativa y facilitar la filtración, conexiones y tubos adecuados para conectar los embudos a la bomba de vacío y el frasco de recepción del filtrado. Cabe resaltar que los embudos y filtro están hechos en acero quirúrgico lo que nos va a permitir la esterilización de estos sin estimar inconvenientes y asegurando así la calidad del proceso.

2.7.1 Validación del método de filtración por membrana usando un tren de tres puestos y un sistema convencional de un puesto para la detección de *Escherichia coli*

Para esta validación se realizó la comparación entre los dos sistemas de filtración presentes en el laboratorio, el proceso se realizó de la siguiente manera: Se realizó el inóculo de un cultivo joven de *E. coli* en 30mL de agua

peptonada y se ajustó a una concentración de 3×10^8 UFC/mL con la ayuda del espectrofotómetro, una vez listo el inóculo se procedió a realizar diluciones seriadas hasta 10^{-7} la cual se inóculó 1mL en tubos de ensayo que contenían 9mL de agua peptonada hasta la dilución 10^{-6} el tubo 10^{-7} contenía 36mL de agua peptonada y fue inóculado con 4mL de la dilución 10^{-6} obteniendo un volumen final de inóculo de 40mL el cual será pasado a un recipiente estéril que contenía 360mL de agua peptonada para filtrar 100 mL por triplicado. Este proceso se hizo para ambos sistemas en las mismas condiciones.

- **Prueba de repetibilidad**

Para esta prueba se realizó el mismo procedimiento del apartado 2.6. Fueron realizadas 3 repeticiones de la prueba con la dilución 10^{-7} .

- **Prueba de reproducibilidad**

Para esta prueba se realizó el mismo procedimiento del apartado 2.6, 3 repeticiones del método con un analista diferente.

- **Análisis estadístico de la validación**

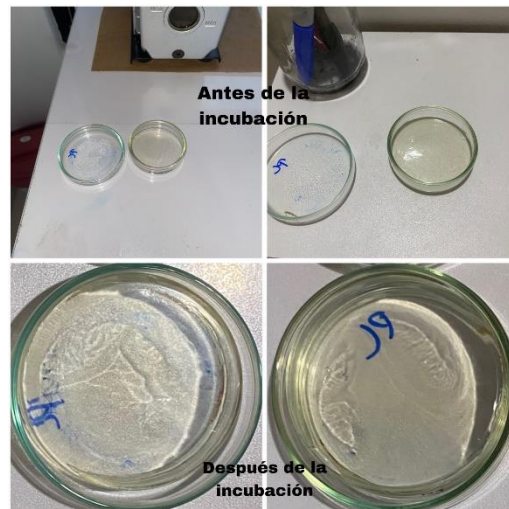
Para el análisis estadístico se utilizó el programa PASW Statistics 18 mediante la prueba estadística de Análisis de varianza (ANOVA) para determinar la reproducibilidad y repetibilidad.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Control de ambientes

El control de ambiente fue realizado durante los días en el que se realizó el proceso de validación en el laboratorio de microbiología de la empresa. Se obtuvieron resultados óptimos puesto que no hubo crecimiento de microorganismos mesófilos y mohos y levaduras. Esto nos indica que los procesos de limpieza y desinfección implementados en el laboratorio de microbiología de la empresa son óptimos y realizados correctamente.

Figura 2. Resultados del control de ambientes realizado en el laboratorio de microbiología



Fuente: Autor

3.2. Control de calidad de los medios de cultivo

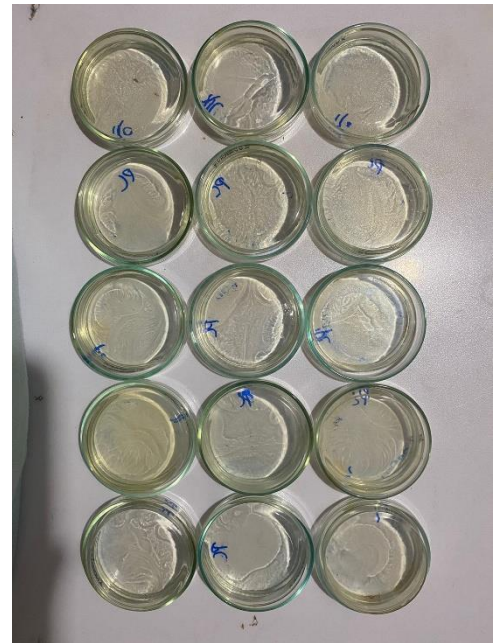
Para garantizar la seguridad y la validez de los ensayos realizados, fue esencial confirmar la esterilidad de los medios de cultivo utilizados, en los resultados pudimos observar que no hubo contaminación alguna en las cajas que fueron incubadas en las condiciones dadas, lo que nos da a entender que los medios de cultivo fueron procesados correctamente cada uno como lo indica su casa comercial lo que nos garantizó que los medios de cultivo se encontraban en condiciones óptimas para su uso en los ensayos determinados.

Figura 3. Resultados de las cajas Petri con agar Chromocult



Fuente: Autor

Figura 4. Resultados de las cajas Petri con agar PCA



Fuente: Autor

3.3. Control de calidad de la autoclave

Las ampollas Sterikon Plus Bioindicator fueron utilizadas con el fin de verificar la eficiencia de los procesos de esterilización en la autoclave, este proceso se realizó una vez al mes al momento de realizar la validación, una vez culminado el proceso de esterilización pudimos observar que esta ampolla se mantuvo en su color inicial, lo que nos indica que las esporas de *Geobacillus stearothermophilus* que son las bacterias que contienen las ampollas ya que éstas son resistentes al calor fueron eliminadas eficientemente debido a que las ampollas al conservar su color después de la esterilización nos confirma un proceso exitoso, al contrario si la esterilización no hubiera sido eficiente, las esporas habrían germinado y crecido virando de rosa a un color amarillento en las esporas. Entonces al no observar cambios de color amarillo en las pruebas realizadas, nos asegura que no hubo fallos en la esterilización.

Figura 5. Resultados de las cajas Petri con agar Chromocult



Fuente: Autor

3.4. Estandarización del inóculo

El proceso de estandarización del inóculo nos permitió determinar la concentración bacteriana de cada una de las cepas utilizadas, esto con el fin de establecer la dilución de trabajo, la cual es fundamental para la verificación y selectividad de los medios de cultivo. Para este trabajo se seleccionó la cepa de referencia de *Escherichia coli* ATCC 25922 y la cepa interferente *Staphylococcus aureus* ATCC 6438. Se determinó que a una densidad óptica de 0,3 a 600 nm una concentración de $1,5$ a $3,0 \times 10^8$ UFC/mL como se observa en la figura 2, conforme a los requisitos normativos [16]. Se debe resaltar que los inóculos fueron usados en su fase estacionaria para asegurar una población celular estable y homogénea, ya que en esta fase el número de células no varía significativamente, lo que nos permitió minimizar errores sistemáticos entre los analistas que participaron en este proceso [17].

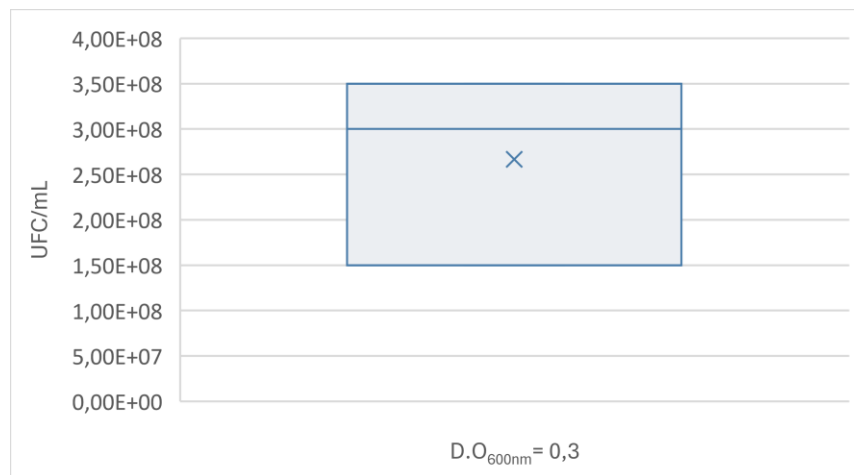


Figura 6. Determinación de la concentración bacteriana a una D.O_{600nm} = 0,3

3.5. Pruebas de productividad y selectividad

La norma ISO 17025 establece los requisitos que deben cumplir los laboratorios de ensayo y calibración para asegurar su competencia técnica y la validez de sus resultados [7]. Esta norma es fundamental para garantizar la

calidad de los análisis microbiológicos y la confiabilidad de los resultados obtenidos. Parte de estos requisitos incluye el control y aseguramiento de la calidad de los materiales utilizados, como los medios de cultivo y las cepas de referencia. Por lo tanto, para evaluar la calidad de los medios de cultivo utilizados en este estudio, se realizaron ensayos de productividad y selectividad. En donde se comparó un medio de control (PCA) en donde los microorganismos crecen en óptimas condiciones, con el medio a evaluar (Chromocult) para determinar la productividad y selectividad de este.

Una vez reactivadas las cepas, se procedió a evaluar la calidad de los medios mediante la prueba del método ecometrico, a partir de este análisis se pudo evaluar el crecimiento de las cepas de referencia *E. coli* ATCC 25922 en agar Chromocult y agar PCA como medio de cultivo control para determinar la eficacia de los medios de cultivo en el desarrollo de microorganismos por medio de la determinación de la productividad.

Por otro lado, también se utilizó el método de proporción de productividad (PR) y el índice de crecimiento absoluto (ICA) como se indica en la tabla 2. Allí se puede observar que el medio de cultivo Chromocult con un PR de 0,79 para *E. coli* y un PR de 0 para *S. aureus* está dentro del rango de aceptación, lo que nos denota que este medio es altamente eficiente para el crecimiento de microorganismos selectivos. Por otro lado, tenemos el índice de crecimiento absoluto en donde se pudo comparar el medio control con el medio referente, para el medio control (PCA) se obtuvo un ICA de 4,4 para *E. coli* y un ICA de 4,8 para *S. aureus* lo que nos indica que ambos medios cumplen con los parámetros establecidos indicando su alto grado de productividad. Mientras que para el medio de cultivo Referente la selectividad se determinó de la siguiente manera: para *E. coli* se obtuvo un ICA de 3.5 lo que nos indica un alto grado de selectividad, mientras que para *S. aureus* se obtuvo un ICA de 0 lo que nos indica que este medio inhibe totalmente el crecimiento de esta bacteria, lo que nos sugiere que el medio de referencia Chromocult para *E. coli* no solo es efectivo para el crecimiento de esta bacteria, sino que también inhibe el crecimiento de cepas interferentes como *S. aureus*.

Tabla 2. Productividad y selectividad de los medios de cultivo

Medio de Cultivo	Medición	M.O	Metodo de control	Criterio
Chromocult	Productividad	<i>E. coli</i>	Cuantitativo	PR = 0,79
			Semicuantitativo	ICA = 3,5
			Cualitativo	Score = 2
	Selectividad	<i>S. aureus</i>	Cuantitativo	PR = 0
			Semicuantitativo	ICA = 0
			Cualitativo	Score = 0
PCA	Productividad	<i>E. coli</i>	Semicuantitativo	ICA = 4,4
			Cualitativo	Score = 2
		<i>S. aureus</i>	Semicuantitativo	ICA = 4,8
			Cualitativo	Score = 2

Los resultados obtenidos destacan que la prueba del método ecometrico es una herramienta eficaz para evaluar la capacidad de un medio de cultivo en la recuperación de una cepa en estudio. Se puede notar que los medios utilizados favorecen tanto a la productividad como a la selectividad de los microorganismos, asegurando resultados confiables en los ensayos realizados [18].

El medio de cultivo Chromocult al mostrar altas proporciones de productividad y altos índices de crecimiento absoluto con *Escherichia coli* y una completa inhibición de *Staphylococcus aureus*, demuestra ser efectivo y selectivo. Esto respalda su uso en estudios microbiológicos donde la precisión y la confiabilidad son esenciales.

3.6. Validación del método de filtración por membrana usando un tren de tres puestos y un sistema convencional de un puesto para la detección de Coliformes totales y *Escherichia coli*

- **Repetibilidad y reproducibilidad**

Los ensayos de repetibilidad se llevaron a cabo bajo las mismas condiciones de manipulación por triplicado, asegurando que las condiciones fueran constantes para garantizar la confiabilidad de los resultados, tabla 3. A su vez para los ensayos de reproducibilidad fueron realizados por diferentes analistas para evaluar la consistencia de los resultados entre distintos operadores, se realizaron tres ensayos para la dilución 10^{-7} donde se encontraron los valores de mejor cuantificación.

Tabla 3. Conteo obtenido mediante los ensayos realizados para la prueba de repetibilidad como resultado de la filtración por membrana para la cepa de E. coli ATCC de la dilución 10^{-7}

Tiempo	Dilución	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4	Ensayo 5	Ensayo 6	Promedio	Desviación estandar
48 horas	10^{-7}	38	40	45	36	46	42	41,1666667	3,92003401

De acuerdo con los resultados de repetibilidad obtenidos en la tabla 3 se puede notar que los parámetros de repetibilidad estuvieron dentro de los parámetros establecidos debido a sus resultados consistentes a la hora de realizar los ensayos bajo las mismas condiciones, estos resultados pueden deberse a las condiciones de medición constantes del laboratorio a la hora de realizar los ensayos, es importante tener un ambiente controlado (temperatura y humedad relativa), usar los mismos equipos, procedimientos estandarizados entre otros ya que todos estos parámetros garantizan que las mediciones sean precisas y consistentes [15].

Por otro lado, para comprobar que el método cumple con los parámetros de reproducibilidad se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) tabla 4, en donde se plantearon varias hipótesis:

Hipótesis nula (H_0): No hay diferencias significativas las medidas obtenidas por los dos operarios. (Si el valor crítico de F es mayor al valor de F calculado se acepta H_0)

Hipótesis relativa (H_1): hay diferencias significativas las medidas obtenidas por los dos operarios. (Si el valor crítico de F es menor al valor de F calculado se rechaza H_0)

Tabla 4. Resultados obtenidos del análisis de varianza para la reproducibilidad del método realizado por analistas diferentes.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,67	1	0,67	0,04	0,844	7,709
Dentro de los grupos	60,67	4	15,17			
Total	61,33	5				

En esta tabla se puede observar como el valor crítico de F es mayor al F calculado, por lo tanto, se acepta la hipótesis H_0 , por lo cual no hay diferencias significativas en las medidas obtenidas por los dos analistas.

Así mismo para comprobar la reproducibilidad de los sistemas de filtración se realizó mediante el mismo análisis estadístico, ANOVA y los resultados obtenidos se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Resultados obtenidos del análisis de varianza para la reproducibilidad de los dos sistemas de filtración.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	44,25	3	14,75	0,45	0,73	4,07
Dentro de los grupos	264	8	33			
Total	308,25	11				

Hipótesis nula (H_0): No hay diferencias significativas en las medidas obtenidas al filtrar en el sistema convencional o en el tren de filtración. (Si el valor crítico de F es mayor al valor de F calculado se acepta H_0)

Hipótesis relativa (H_1): hay diferencias significativas en las medidas obtenidas al filtrar en el sistema convencional o el tren de filtración. (Si el valor crítico de F es menor al valor de F calculado se rechaza H_0)

En esta tabla se puede observar como el valor crítico de F es mayor al F calculado, se acepta la hipótesis del H_0 , lo que nos indica que no hubo diferencias significativas en las mediciones de los filtros.

Los valores obtenidos en los ensayos de repetibilidad mostraron una alta consistencia, indicando que el método de filtración por membrana es preciso cuando se utiliza bajo condiciones controladas.

Así mismo los ensayos de reproducibilidad demostraron que el método también es robusto, ya que los diferentes analistas obtuvieron resultados comparables.

Estos resultados confirman que el método de filtración por membrana, utilizando un tren compuesto de tres embudos y un sistema convencional de un solo embudo, resulta ser confiable para ambos casos en la detección de coliformes totales y *Escherichia coli*. La validez del método se respalda en la capacidad de obtener resultados repetibles y reproducibles, lo que es crucial para la precisión de los análisis microbiológicos.

3.7. Implementación de un tren de filtración de tres puestos como medio para optimizar el tiempo y la eficacia en los resultados de la filtración por membrana

Las diferencias entre los resultados del tren de filtración y el sistema de filtración convencional de un solo embudo, es casi nula, debido a que estos presentaron resultados muy cercanos a la hora de realizar las pruebas. Lo que nos da a entender que el tren de filtración implementado en el laboratorio se encuentra en óptimas condiciones para operar garantizando resultados precisos y confiables.

La implementación del tren de filtración al vacío aguarda muchas ventajas en su uso: este sistema cuenta con una mayor eficiencia en los tiempos de análisis debido a que al filtrar tres muestras diferentes simultáneamente, se reduce significativamente el tiempo total del análisis. A su vez el diseño del sistema es sencillo y fácil de montar, lo que facilita su uso en diversos entornos del laboratorio. La utilización de este tren en el análisis de agua potable es de gran importancia debido a su capacidad para mejorar la precisión, eficiencia y confiabilidad del proceso analítico. Este sistema, como ya se mencionó ayuda a reducir el tiempo de análisis, mejora la calidad del filtrado y minimiza la contaminación cruzada ya que al tener tres puestos permite filtrar diferentes muestras en paralelo sin mezclarlas.

4. CONCLUSIONES

- El método de filtración por membrana utilizado en el laboratorio de análisis de aguas se ha comprobado como confiable y reproducible, ya que gracias a la prueba estadística utilizando el software ANOVA, nos ha revelado que no existen diferencias significativas en los promedios de los ensayos de repetibilidad y reproducibilidad para las cepas estudiadas.
- El agar Chromocult demostró alta productividad y selectividad para *Escherichia coli* inhibiendo microorganismos interferentes y cumpliendo con los criterios de aceptación establecidos por la norma.
- Se logró determinar que la filtración por membrana para la detección de Coliformes totales y *Escherichia coli* tuvo un alto nivel de robustez indicando así resultados buenos independientemente del analista que realice la prueba.
- La investigación validó el método de filtración por membrana y las técnicas asociadas como herramientas eficaces para la detección de coliformes totales y *Escherichia coli* en aguas utilizadas en la industria, esto nos garantiza que puede ser aplicada de manera consistente por diferentes analistas asegurando la calidad del agua y la seguridad a la hora de entregar resultados.
- Un tren de filtración al vacío, resulta ser un sistema bastante eficaz, resulta ser muy útil en laboratorios donde se manejan grandes volúmenes de muestras o cuando se necesita optimizar el tiempo de filtración.

5. AGRADECIMIENTOS

Agradezco primeramente a Dios, por haberme brindado cada día sabiduría, entendimiento, paciencia, comprensión y amor durante el proceso de elaboración de mi tesis. Ante mano expreso mi tan anhelada felicidad de saber que esta etapa la he culminada con mucha fe en Dios y en mí. A mi familia les agradezco de todo corazón por la ayuda económica y el apoyo incondicional que me brindaron en los momentos tristes y difíciles. Les agradezco por su amor, por la perseverancia, por sus constantes alientos que necesité para enfrentar los desafíos de esta etapa. A todos muchas gracias, pero sobre todo a estas personas; a mi madre Zulima Murillo que desde la distancia siempre estuvo pendiente de mí, a mi otra madre, Mariela Murillo por el apoyo que siempre me brinda cuando más lo necesitaba.

También, le agradezco de ante mano a mi director de tesis Carlos Aranaga por el compromiso, la paciencia, el apoyo constante, sus consejos, su visión crítica y por su profundo conocimiento que hicieron de mí una persona segura ante los retos y desafíos que se presentaron en el camino, una vez más le doy las gracias por todo. De igual manera, extendiendo mis agradecimientos a todos los miembros del comité de tesis, por el tiempo que dedicaron para la revisión de esta tesis, sus valiosas observaciones y sugerencias serán de gran importancia para mejorar la calidad de mi investigación.

Además, quiero agradecerle profundamente a la señora Sandra, por haberme abierto las puertas de su Empresa para realizar mi etapa práctica, sin ella no sería posible culminar este proceso, gracias nuevamente por esa valiosa ayuda, aprendizaje y la experiencia profesional que he adquirido en este largo tiempo trabajando en su Empresa. Finalmente, en este camino, largo pero sustancioso, paso agradecerles a todas aquellas personas que no mencione anteriormente pero que de una u otra manera han hecho posible este logro, el cual representa un hito significativo en mi vida personal y profesional.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Jáuregui, B. (2017). Validación secundaria del método de filtración por membrana para la detección de coliformes totales, *Escherichia coli* y *pseudomonas aeruginosa* en aguas empleadas en pasteurizadora santo domingo s.a. Universidad de Pamplona.
- [2] Diaz-Solano, B., Esteller, M., & Garrido, S. (2011). Calidad fisicoquímica y microbiológica del agua en parques acuáticos. *Hidrobiológica*, 21(1), 49-62 https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0188-88972011000100005&script=sci_abstract
- [3] Suárez, K. L. (2015). Validación del método filtración por membrana para análisis microbiológico de coliformes totales y *Escherichia coli* en aguas marinas. *Boletín científico CIOH*, 33, 215-220. https://doi.org/10.26640/01200542.33.215_220
- [4] Molina, J. E., & Morales, S. A. (2018). El derecho humano al agua potable en Colombia: decisiones del Estado y de los particulares. *Universitas* url, 67(136), 1-14. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0041-90602018000100043&lng=es&nrm=is&tlng=es#:~:text=63%2FRev.,por%20parte%20de%20los%20particulares
- [5] Elincer, E., Salcedo, M., Muñoz, M., & Mendoza, R. (2010). Validación de la técnica de recuento de coliformes totales y e. coli por el método filtración de membrana en el laboratorio de control de calidad de aguas de Cartagena s.a.e.s.p. *Corporación universitaria Rafael Nuñez*, 2(1), 21-30.
- [6] Giménez, M. (s. f.). filtración - Tren de filtración para laboratorio en Uruguay- ilión analítica. *Ilión Analítica*. <https://ilion.com.uy/tren-de-filtracion/>
- [7] ICONTEC, Calidad del agua. Guía para la orientación acerca de la validación de métodos de análisis microbiológicos. <https://tienda.icontec.org/gp-calidad-del-agua-guia-para-la-orientacion-acerca-de-la-validacion-de-metodos-de-analisis-microbiologicos-gtc84-2003.html>
- [8] ICONTEC - Instituto Colombiano de normas Técnicas y certificación. 2008, Norma técnica colombiana NTC 4772 de 30 de abril de 2008. Calidad del agua. Detección y Recuento de *Escherichia coli* y de bacterias coliformes. Parte 1:Método de Filtración por Membrana. Primera actualización. Bogotá D.C., Colombia
- [9] Krikorian, AD. (1991). Medios de cultivo: Generalidades, composición y preparación. En: Roca, William M.; Mroginiski, Luis A. (eds.). *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, CO. p. 41-77.
- [10] Merckmillipore.com. Recuperado el 11 de julio de 2024, de https://www.merckmillipore.com/CO/es/product/Sterikon-plus-Bioindicator,MDA_CHEM-110274
- [11] APHA-AWWA-WPCF. 1992. Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales. American Public Health Association-American Water Works Association-Water Pollution Control Federation. Ediciones Díaz Santos, S.A. 17ª Ed. Madrid. España.
- [12] Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics. (2015). U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Analytical-Procedures-and-Methods-Validation-for-Drugs-and-Biologics.pdf>
- [13] Carrillo, E. M., Lozano, A. M. (2008). Validación del método de detección de coliformes totales y fecales en agua potable utilizando Agar Chromocult [Tesis] Universidad Javeriana. <http://hdl.handle.net/10554/8205>.
- [14] Geissler, K., Manafi, M., Amoró, S.I. y Alonso, J.L. (2000). Quantitative determination of total coliforms and *Escherichia coli* in marine waters with chromogenic and fluorogenic media *Journal of Applied Microbiology* 2000, 88: 280-285
- [15] Manterola, C., Grande, L., Otzen, T., García, N., Salazar, P., Quiroz, G. (2018). Confiabilidad, precisión o reproducibilidad de las mediciones. Métodos de valoración, utilidad y aplicaciones en la práctica clínica. *Revista chilena de infectología*, 35 (6), 680-688. https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182018000600680
- [16] McFarland J, 1907. Nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *Jama* 14:1176-1178
- [17] Martínez, I., Flores, L., Pérez, A., & Rivera, S. (2010). VALIDACIÓN SECUNDARIA DE LA TÉCNICA FILTRACIÓN POR MEMBRANA PARA EVALUAR LA REMOCIÓN DE *Escherichia coli* EN MUESTRAS DE AGUAS SINTÉTICAS DESINFECTADAS CON FILTROS CASEROS EKOFIL Y EKOFIL PLUS [Tesis]. Universidad Santiago de Cali.

- [18] Riu, J., Boqué, R., Maroto, A., & Rius, X. EXACTITUD Y TRAZABILIDAD. Universitat Rovira i Virgili.
<http://www.quimica.urv.cat/quimio/general/exatra.pdf>