

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL
Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la
Producción

“VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE DETECCIÓN DE
COLIFORMES TOTALES EN MUESTRAS DE AGUA POTABLE
UTILIZANDO CALDO M - ENDO.”

TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN

Examen Complexivo

Previo la obtención del Título de:

INGENIERA DE ALIMENTOS

Presentado por:

Marcela del Rocío Cerezo Álvarez

GUAYAQUIL - ECUADOR

Año: 2016

AGRADECIMIENTO

A Dios, que me ha dado la fortaleza y capacidad para seguir adelante siempre.

A mis padres, ya que supieron brindarme su apoyo incondicional en todas las facetas de mi vida.

A Laboratorio Lazo por su total apoyo en la realización de este proyecto.

DEDICATORIA


A MI HIJO

A MI ESPOSO

A MIS PADRES

A MIS HERMANOS

TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN



PhD. Jonathan Coronel León

Tribunal Evaluador



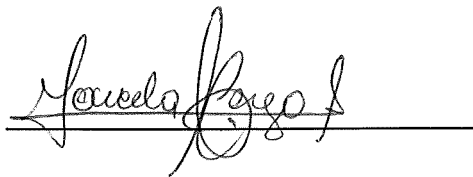
Ing. Cristian Vargas Farías

Tribunal Evaluador

DECLARACIÓN EXPRESA

“La responsabilidad del contenido desarrollado en la presente propuesta de examen complejo me corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual del mismo a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL”

(Reglamento de Graduación de la ESPOL)

A handwritten signature in black ink, written over a horizontal line. The signature is cursive and appears to read 'Marcela de Rocío Cerezo Álvarez'.

Marcela de Rocío Cerezo Álvarez

RESUMEN

La validación realizada en este trabajo tiene como propósito implementar la detección de coliformes totales en muestras de agua potable mediante la técnica de filtración por membrana utilizando el caldo m- Endo, gracias a su fácil manejo y rápida recuperación para reducir tiempos de entrega de resultados a los clientes.

Se realizó una revisión bibliográfica para obtener la información necesaria sobre el método a implementar, estableciendo como guía el Estándar Métodos para análisis de aguas, capítulo 9222B, luego se realizó la técnica de filtración por membrana analizando agua potable con 6 réplicas por cada analista en dos días distintos, mediante las cuales se realizaron recuentos del microorganismo en cada uno de los rangos propuestos.

De acuerdo a los parámetros de validación planteados se cumplieron los objetivos de obtener una precisión $\leq 15\%$ y de exactitud mínimo el 70 % de recuperación del microorganismo inoculado en cada uno de los rangos. Concluyéndose que el método de detección de coliformes totales utilizando la técnica de filtración por membrana es preciso, exacto, reproducible y repetible.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN	I
ÍNDICE GENERAL	II
ABREVIATURAS	IV
SIMBOLOGÍA	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
ÍNDICE DE TABLAS	VII
ÍNDICE DE ANEXOS	VIII
INTRODUCCIÓN	IX
CAPITULO 1	
1 GENERALIDADES	1
1.1. Planteamiento del Problema y Justificación	1
1.2. Objetivos	3
1.2.1. Objetivo General	3
1.2.2. Objetivos Específicos	3
1.3. Marco Teórico	4
1.3.1. Agua Potable	4
1.3.2. Microorganismos Indicadores de la Calidad del Agua	4
1.3.3. Técnica de Filtración por Membrana	9
1.3.4. Validación	11
CAPITULO 2	
2 METODOLOGÍA PARA LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE FILTRACIÓN POR MEMBRANA PARA LA DETECCIÓN DE COLIFORMES TOTALES EN MUESTRAS DE AGUA PARA CONSUMO HUMANO.	16
2.1. Elección de los parámetros de validación.	17
2.2. Diseño Experimental.	18

2.3. Matriz, equipos, materiales, medio de cultivo.	20
2.3.1. Muestras:	20
2.3.2. Equipos.	21
2.3.3. Materiales y Medio de Cultivo.	21
2.4. Diagrama de Flujo del Proceso.	22
CAPITULO 3	
RESULTADOS	24
CAPITULO 4	
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	35
4.1. Conclusiones	35
4.2. Recomendaciones	36
BIBLIOGRAFÍA	37
ANEXOS	38

ABREVIATURAS

ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
UFC	Unidades Formadoras de Colonia
U	Incertidumbre
% RPD	Porcentaje de diferencia entre duplicados
% RSD	Porcentaje de Desviación Standard
E. COLI	<i>Escherichia Coli</i>
SM	Estándar Métodos
ENAC	Entidad Nacional de Acreditación

SIMBOLOGÍA

ml	mililitros
mm	milímetros
°C	grados centígrados
g	gramos
mg	miligramos

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Estructura de *Escherichia Coli*.

Figura 1.2. Ampollas de Caldo m – Endo coliformes.

Figura 2.1 Diagrama de Flujo del Proceso de Filtración por membrana.

Figura 3.1 Resultado del Crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa*.

ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1. Resultados de Ensayo de Repetibilidad y Reproducibilidad de la muestra sin inocular (blanco) – Rango Bajo.
- Tabla 2. Resultados de Ensayo de Repetibilidad y Reproducibilidad de la muestra sin inocular (blanco) – Rango Medio.
- Tabla 3. Resultados de Ensayo de Repetibilidad y Reproducibilidad de la muestra sin inocular (blanco) – Rango Alto.
- Tabla 4. Comparación de los resultados obtenidos por diferentes analistas en el proceso de filtración por membrana – Rango Bajo.
- Tabla 5. Comparación de los resultados obtenidos por diferentes analistas en el proceso de filtración por membrana – Rango Medio.
- Tabla 6. Comparación de los resultados obtenidos por diferentes analistas en el proceso de filtración por membrana – Rango Alto
- Tabla 7. Análisis de Varianza de una muestra filtrada por membrana, por dos analistas en condiciones diferentes de tiempo.
- Tabla 8. Desviación Estándar de una muestra filtrada por membrana, por dos analistas en condiciones diferentes de tiempo.
- Tabla 9. Porcentajes de Recuperación de la Cepa E.coli

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1	Ficha Técnica del medio de cultivo m – Endo Coliformes
Anexo 2	Reactivación de Cepa de Referencia
Anexo 3	Análisis de Varianza Anova - Rango Bajo
Anexo 4	Análisis de Varianza Anova - Rango Medio
Anexo 5	Análisis de Varianza Anova - Rango Alto
Anexo 6	Ensayo de Recuperación – Rango Bajo
Anexo 7	Ensayo de Recuperación – Rango Medio
Anexo 8	Ensayo de Recuperación – Rango Alto

INTRODUCCIÓN

El presente informe detalla el proyecto de validación del método de filtración por membrana para la detección de coliformes totales en muestras de agua para consumo humano realizado en Laboratorio Lazo en el período comprendido entre Octubre de 2013 a Febrero de 2014.

En el capítulo 1, se presentará la justificación del problema planteado, así como los objetivos que persiguen el presente trabajo, el respectivo marco teórico referente a las características del agua potable y microorganismos indicadores de la calidad, además del medio de cultivo utilizado. Finalmente se describen los conceptos de validación y filtración por membrana.

En el capítulo 2, se indicará la metodología planteada, presentando el esquema de la filtración por membrana, materiales, equipos y métodos utilizados y preparación de muestras para análisis.

En el capítulo 3, se analizarán los resultados obtenidos de la filtración por membrana, recuperación del microorganismo blanco, repetibilidad y reproducibilidad obtenida así como el análisis estadístico de los datos.

Finalmente, en el capítulo 4 se indicarán las respectivas conclusiones y recomendaciones respecto a la validación del método propuesto.

CAPÍTULO 1

GENERALIDADES

1.1. Planteamiento del Problema y Justificación

El método generalmente utilizado en el laboratorio de microbiología de Laboratorio Lazo para el recuento de Coliformes totales es el de tubos múltiples, utilizando el caldo Lauril Sulfato, con una siembra posterior en Caldo Verde Brillante - Bilis Lactosa (Caldo Brilla). Este método presenta varias desventajas, una de las más significativas es el tiempo que se debe esperar para obtener resultados (48 a 96 horas). Si, a esto se le añade el tiempo de preparación de medios de cultivo y el requerimiento de personal técnico.

Por tal razón, la presente propuesta busca implementar la detección de coliformes totales a través de la técnica de filtración por membrana utilizando caldo m – endo. Una de las ventajas de esta metodología es que se pueden obtener resultados confiables a las 24 horas.

Dicha técnica es aceptada y utilizada a nivel nacional e internacional. Debido a su fácil manejo se considera que sería un método alternativo para la reducción de tiempos de entrega de resultados a los clientes del laboratorio.

Para asegurar la efectividad de la técnica es necesario iniciar el proceso de validación secundaria. La validación secundaria es una técnica de análisis que consiste en obtener evidencia documentada que permita confirmar que los resultados obtenidos son confiables y reproducibles. Además garantiza que los resultados de los análisis ejecutados en el laboratorio cumplen con los requisitos mínimos de calidad.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo General

Validar el método para la detección de coliformes totales en muestras de agua potable, mediante la técnica de filtración por membrana utilizando el caldo m – Endo.

1.2.2. Objetivos Específicos

Evaluar la exactitud, precisión, repetibilidad y reproducibilidad del método de detección de coliformes totales en muestras de agua potable utilizando el caldo m-endo, por medio de un análisis estadístico de los resultados obtenidos durante el estudio.

Evaluar la efectividad del caldo m – Endo, utilizado en la técnica de filtración por membrana para la detección de coliformes totales en muestras de agua potable.

1.3. Marco Teórico

1.3.1. Agua Potable

Es el agua cuyas características físicas, químicas microbiológicas han sido tratadas a fin de garantizar que es apta para consumo humano (1).

El peligro más común y más difundido relativo al agua potable es el de su contaminación, sea esta directa e indirecta, debido al efecto de aguas servidas, de otros desechos o de las excretas de hombre o de los animales. Si dicha contaminación es reciente y entre los factores que contribuyen a ella se hallan portadores de enfermedades entéricas transmisibles, es posible que estén presentes algunos de los organismos vivos causales de las mismas. Beber agua contaminada o emplearla en la preparación de soluciones puede producir mayor número de casos de infección (2).

1.3.2. Microorganismos Indicadores de la Calidad del Agua.

Varios microorganismos patógenos de transmisión fecal – oral pueden estar presentes en el agua, entre ellos bacterias

como *Salmonella Spp*, *Shigella Spp*, *Coliformes Totales* y *Fecales*, los cuales han sido encontradas en abastecimientos de aguas.

Las bacterias coliformes, son el principal indicador de la adecuación del agua para uso doméstico, industrial, o de otro tipo. Se ha demostrado que el grupo coliformes es un indicador del grado de contaminación y por lo tanto, de la calidad sanitaria.

Desde hace tiempo, se reconoce que los organismos del grupo coliformes son un buen indicador microbiano de la calidad del agua potable, debido principalmente a que son fáciles de detectar y enumerar en el agua. La presencia de *Escherichia coli* en muestras de agua potable, indica la existencia de fallas en la eficacia de tratamiento de aguas, integridad y sistemas de distribución.

1.3.2.1. Coliformes Totales.

El grupo coliformes incluye bacterias de forma bacilar, aeróbicas y facultativas anaeróbicas, gram negativas, no formadoras de esporas, las cuales fermentan la lactosa

conformación de gas en un período de 48 horas a 35°C.

Pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*.

El número de organismos coliformes en los excrementos humanos es muy grande; la secreción diaria por habitante varía entre 125×10^9 y 400×10^9 . Su presencia en el agua se considera un índice evidente de la ocurrencia de polución fecal y, por tanto, de contaminación con organismos patógenos. Del grupo coliforme forman parte varios géneros: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, etc.

El ensayo para grupo coliformes se puede realizar utilizando para técnicas como son los tubos múltiples, técnica de filtración por membrana o el ensayo presencia – ausencia.

La formación de gas en un tubo de fermentación de caldo lauril sulfato, en 48 horas a 35°C, es evidencia presuntiva de miembros del grupo coliformes, y se siguen diversos pasos para confirmar la presencia de coliformes totales, no así en la técnica de filtración por membrana ya que todos los organismos producen una colonia oscura por lo general rojo púrpura, después de incubación de 24 horas.

A diferencia del ensayo con tubos múltiples (NMP), el conteo con filtración por membrana es un conteo real y no estadístico.

Dentro del grupo de los coliformes totales existe un subgrupo que es el de los Coliformes fecales. Los coliformes fecales son coliformes totales que además fermentan la lactosa con producción de ácido y gas en 24-48 horas a temperaturas comprendidas entre 44 y 45°C en presencia de sales biliares. Los coliformes fecales comprenden principalmente *Escherichia coli* y algunas cepas de *Enterobacter* y *Klebsiella*.

Su origen es principalmente fecal y por eso se consideran índices de contaminación fecal. Pero el verdadero índice de contaminación fecal es *Escherichia coli* tipo I ya que su origen fecal es seguro (2).

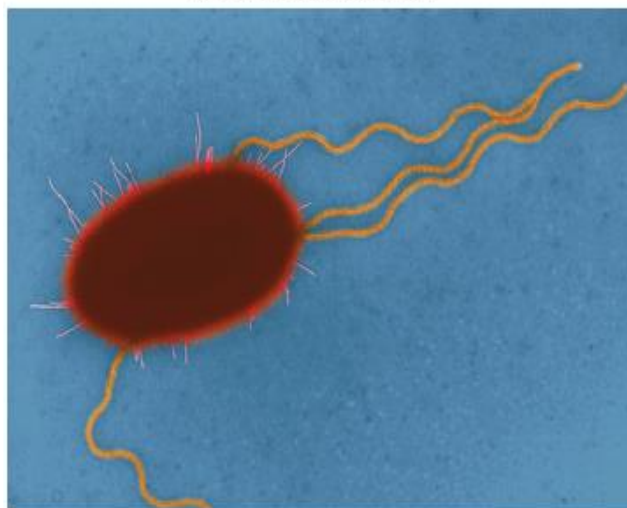
1.3.2.2. *Escherichia Coli*.

Las bacterias del grupo de los coliformes totales que son capaces de fermentar lactosa a 44-45 °C se conocen como coliformes termotolerantes. En la mayoría de las aguas, el género predominante es *Escherichia*, la cual se puede distinguir de los demás coliformes termotolerantes por su

capacidad para producir índol a partir de triptófano o por la producción de la enzima β -glucuronidasa. *E. coli* está presente en concentraciones muy grandes en las heces humanas y animales, y raramente se encuentra en ausencia de contaminación fecal, aunque hay indicios de que puede crecer en suelos tropicales. Entre las especies de coliformes termotolerantes, además de *Escherichia coli*, puede haber microorganismos ambientales.

La presencia de *Escherichia coli* en el agua es una fuerte indicación de una reciente contaminación de aguas residuales o contaminación de residuos de animales (3)

Figura1.1 Estructura de *Escherichia Coli*



Fuente: Colegio de Agricultura y Ciencias de la Vida.

1.3.3. Técnica de Filtración por Membrana.

El número de coliformes totales presentes en el agua se determina mediante la filtración de volúmenes específicos de la muestra a través de filtros de membrana. Por lo general, están compuestos de ésteres de celulosa, típicamente con poros de 0,45 µm de diámetro que retienen los coliformes totales y otras clases de bacterias presentes en la muestra. Después se incuban las membranas vueltas hacia arriba en un medio selectivo.

En la práctica, la técnica de filtración de membrana ofrece resultados comparables a los que se obtienen con el método de tubos múltiples.

Esta técnica puede aplicarse en el análisis de casi todos los tipos de agua, también se utiliza en el análisis de leche y otros alimentos líquidos.

1.3.3.1. Filtros de Membrana

Los filtros de membrana son filtros de superficie, que muestran una estructura microporosa precisa. Durante la filtración las partículas mayores que los poros de la

membrana son retenidas de forma fiable en la superficie de la misma. Las partículas más pequeñas pueden pasar el filtro.

1.3.3.2. Medio de Cultivo.

Se utiliza el Caldo m-Endo para el recuento de coliformes totales. Este es un medio para el aislamiento selectivo de los coliformes totales pues lleva inhibidores para el resto de microorganismos.

El lauril sulfato y desoxicolato que forman parte de la fórmula del medio permite crecer a los coliformes lactosa positivo pero inhibe el crecimiento del resto de bacterias acompañantes. Las colonias lactosa positiva se colorean de rojo por la liberación de fucsina del sulfato de fucsina. Las colonias de *E. coli* y de los coliformes muestran generalmente un brillo metálico.

Es un medio de cultivo en ampollas de plástico que tienen un volumen aproximado de 2 ml, de color rosa a púrpura claro con ligeros precipitados y un pH 7.2 ± 0.2 .

Figura1.2 Ampollas de caldo m – Endo coliformes.



Fuente: www.merckmillipore.com

1.3.4. Validación.

La validación puede definirse como el conjunto de procesos desarrollados para la confirmación mediante examen y la aportación de evidencias objetivas que demuestren el cumplimiento de ciertos requisitos para el uso específico previsto de los procedimientos analíticos.

La validación de procedimientos se realiza cuando se pone en marcha una técnica analítica. Su objetivo es garantizar que los métodos cumplen determinados criterios, en términos de precisión, exactitud, etc. El proceso de validación es variable en función de diferentes criterios, como si se trata de un método normalizado o no y el tipo de método según sea un método cualitativo o cuantitativo.

La validación es un proceso basado en estudios sistemáticos de laboratorio, mediante la cual se pone de manifiesto que un procedimiento analítico determinado posee unas características de funcionamiento adecuadas a la aplicación que se le quiere dar. Por tanto, una validación de un método de análisis incluye 2 aspectos fundamentales: por una parte, la evaluación de los parámetros de calidad del método y del proceso, y por otra la adecuación de los mismos a unos requerimientos analíticos concretos determinados de antemano.

1.3.4.1. Parámetros de validación de un método.

Los parámetros de validación de un método son las características del mismo, que le hacen apto para un uso previsto. La Guía de Validación de la Entidad Nacional de Acreditación – ENAC, ya indica una serie de parámetros a tener en cuenta.

Los parámetros de validación de un determinado método deben estudiarse para cada microorganismo blanco y para cada muestra.

Algunos de estos parámetros son:

Veracidad.

Es el grado de concordancia entre el resultado de una medición y el valor de referencia aceptado. Su estudio implica disponer de un material de referencia frente al que comprobar si existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores obtenidos por aplicación del método del laboratorio y el valor de referencia.

Precisión.

Es el grado de concordancia entre los resultados obtenidos al aplicar el procedimiento analítico repetidas veces bajo condiciones establecidas. La precisión depende solo de la distribución de errores aleatorios y no tiene ninguna relación con el valor verdadero o el valor especificado.

En el caso de que las condiciones establecidas sean mismo operador, laboratorio, aparato, en corto intervalo de tiempo y sobre la misma muestra y la diferencia entre 2 resultados de ensayo pueda esperarse dentro de una determinada probabilidad (95%) a este valor se le llama *repetibilidad*.

En el caso de que las condiciones establecidas permitan cambiar (operador, laboratorio, aparato, etc.) y la diferencia entre 2 resultados de ensayo pueda esperarse dentro de una determinada probabilidad (95%), a este valor se le llama *reproducibilidad*.

1.3.4.2. Técnica para la validación

Para la validación es conveniente utilizar una o varias de las técnicas siguientes para la determinación del desempeño de un método:

- 1) Contaminación de muestras artificialmente. La validación de métodos microbiológicos debe ser reflejo de las condiciones de ensayo reales. Esto se puede conseguir utilizando muestras contaminadas naturalmente o muestras contaminadas o fortificadas a un determinado nivel.
- 2) Uso de materiales de referencia o materiales de referencia certificados.
- 3) Comparaciones interlaboratorios. Esto es aplicable cuando no es posible utilizar ninguno de los métodos anteriores, es decir, no es posible realizar contaminación artificial de las muestras, no se puede disponer de muestras de valor de

referencia estable, o cuando siéndolo no se disponga de cantidad suficiente. Esta sistemática se basa en la utilización de resultados de intercomparaciones en las que haya participado el laboratorio, y utilizar estos datos como valores de referencia. (4)

CAPÍTULO 2

2 METODOLOGÍA PARA LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE FILTRACIÓN POR MEMBRANA PARA LA DETECCIÓN DE COLIFORMES TOTALES EN MUESTRAS DE AGUA PARA CONSUMO HUMANO.

De acuerdo a los objetivos planteados, establecimos la siguiente metodología:

- Elegir los parámetros de validación y establecer el diseño experimental a realizar.
- Establecer las matrices (blanco, microorganismo estándar y muestras), los equipos, materiales, medio de cultivo.
- Realizar el diagrama de flujo del método de análisis.

2.1. Elección de los parámetros de validación.

Los parámetros y objetivos que utilizamos en la validación del método de detección de coliformes totales son los siguientes:

- **Precisión:**

La precisión establecida a través de la repetibilidad y reproducibilidad tiene como objetivo cumplir con que los datos sean $\leq 15\%$ en todos los rangos de concentración, de acuerdo a la guía para calcular la incertidumbre de los métodos de recuento microbiológico (6).

- **Exactitud:**

La exactitud se expresa a través del porcentaje de recuperación del microorganismo estándar, para este caso la Cepa de *Escherichia coli* debe tener una recuperación de mínimo el 70 % en todos los rangos de concentración, de acuerdo a la validación de métodos microbiológicos de la farmacopea de los Estados Unidos (7).

- **Intervalo de Trabajo :**

Se proponen los siguientes intervalos de trabajo tomando en consideración que el método debe ser capaz de detectar, si hubiera, la presencia de al menos 1 colonia, y además también el filtro de membrana no permite el recuento de microorganismos mayores a 200 colonias.

Los rangos de trabajo establecidos son:

Rango Bajo: 1 – 19 UFC

Rango Medio: 20 – 99 UFC

Rango Alto: 100 – 150 UFC

2.2. Diseño Experimental.

A continuación se establece el diseño experimental a seguir tomando en consideración los parámetros de validación elegidos y todas variables que lo acompañan:

- **Esquema:** Seis repeticiones de cada rango, preparadas cada día.
- **Repetibilidad:** Trabajar en tres rangos de concentración, por sextuplicado en cada nivel y matriz.

- **Reproducibilidad:** Repetición del diseño anterior en dos días distintos por cada analista y por dos analistas, en total 2 días distintos.
- **Exactitud:** Determinación de la recuperación del microorganismo estándar en los 3 rangos de concentración, por sextuplicado.
- **Intervalo de trabajo:** Durante la validación se establece si los rangos escogidos fueron acordes a la validación o si hubo cambios.
- **“Muestras” de las que se dispone para la validación:**
- **Microorganismo:** Se utilizan como microorganismos de trabajo las siguientes cepas de referencia:

Escherichia coli / ATCC 11229.

Pseudomona aeruginosa / ATCC 9027
- **Muestra de Análisis:** Se utiliza agua potable que previamente ha sido esterilizada, para tener la seguridad que no contiene microorganismos que pudieran dar falsos positivos.

- **Procesamiento:** Simultáneo de las unidades cada día en condiciones de Repetibilidad.
- **Lectura:** Lectura directa (UFC / ml).
- **Tratamiento Estadístico:** Análisis de varianza y la obtención de: Intervalo de trabajo validado, obtención del porcentaje de repetibilidad, reproducibilidad y recuperación del microorganismo.

2.3. Matriz, equipos, materiales, medio de cultivo.

2.3.1. Muestras:

Blanco: Se realizan 6 blancos de muestra sin inocular, utilizando agua potable estéril.

Estándar (Microorganismo): Se siembran 6 placas de microorganismos de concentración conocida (3×10^8 UFC), preparadas a partir de la comparación con la escala de MC Farland 0.5.

Para la implementación del método y utilización del microorganismo se estandarizó la lectura con el tubo Mc Farland 0.5, para comprobar mediante turbidez comparada con el microorganismo que se estaba partiendo de 3×10^8 UFC,

verificándose en los recuentos del estándar en cada uno de los rangos.

Muestra: Se preparan tres rangos de concentración del microorganismo más la muestra de agua potable: bajo, medio y alto.

A partir de las muestras inoculadas se continuará con el ensayo tal como se indica en el diagrama de flujo del proceso indicado en 2.4.

Al término de la incubación se registrará el conteo de cada una de las placas, los cuales servirán para calcular la repetibilidad y la reproducibilidad.

2.3.2. Equipos.

- Incubadora de 35 °C
- Equipo de filtración por membrana.
- Cabina de flujo laminar

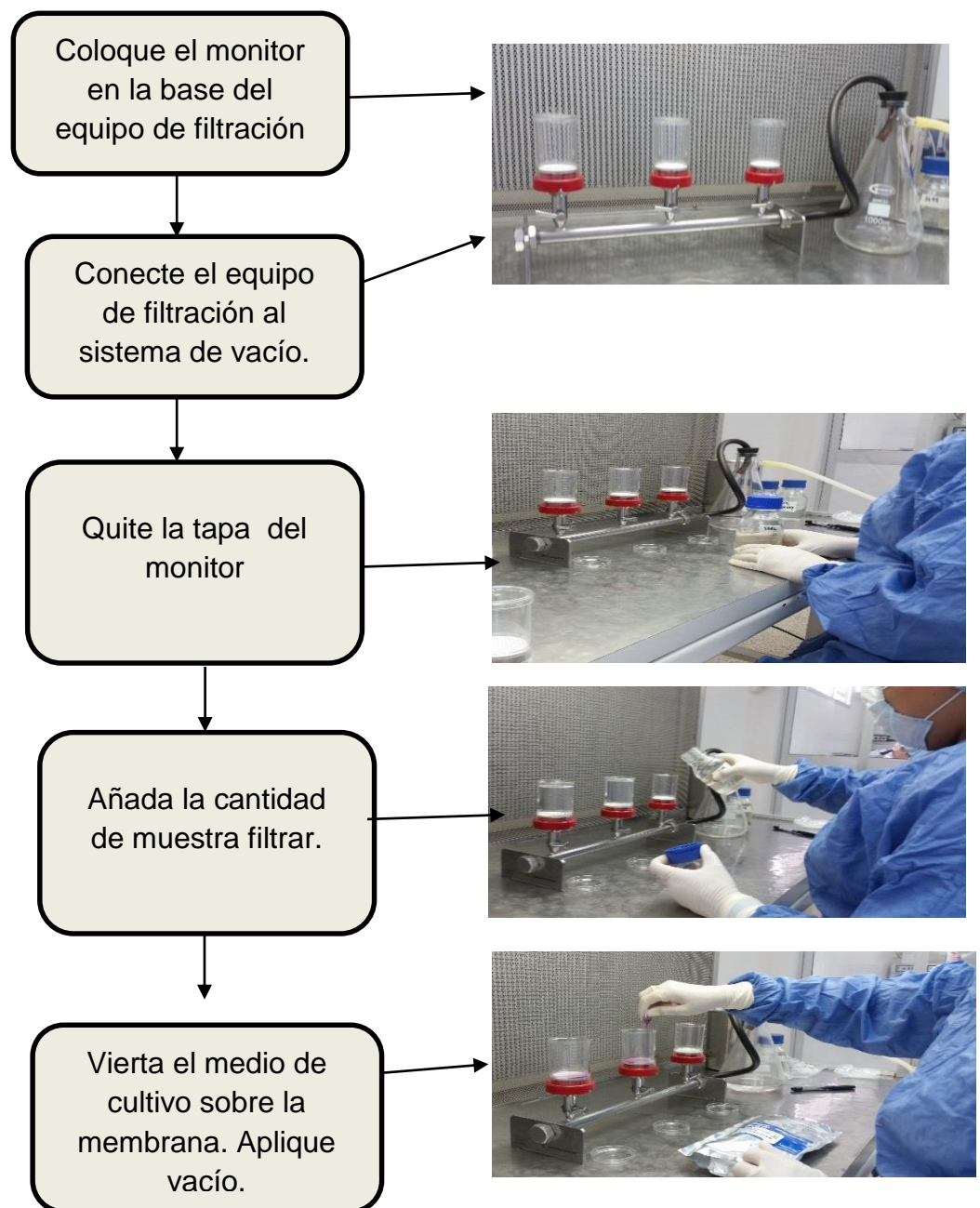
2.3.3. Materiales y Medio de Cultivo.

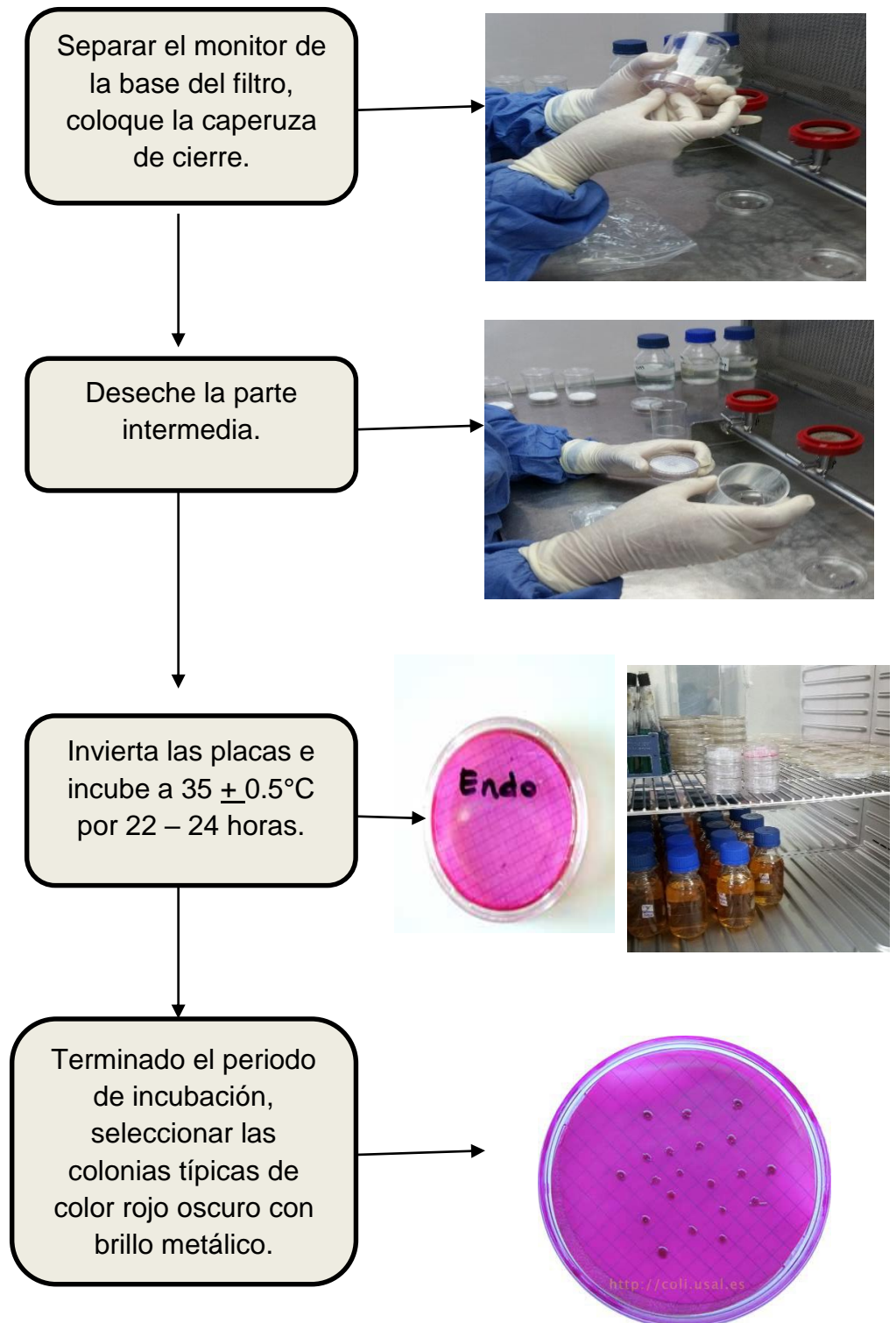
- Filtros de membrana de 47 mm de diámetro.
- Monitores biológicos estériles (desechables de 100 ml) más la tapa de la base del monitor.

- Pipetas de transferencia de 10 ml
- Medio de Cultivo: Caldo m- Endo Coliforme

Marca: Milipore; CAT No: MHA000P02E.

2.4. Diagrama de Flujo del Proceso.





CAPÍTULO 3

RESULTADOS

Los resultados obtenidos de acuerdo a la metodología planteada fueron los siguientes:

- **Cepas de Referencia:** Para realizar el proceso de validación se trabajó con cepas de referencia certificadas:

Escherichia coli- ATCC 11229

Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027.

Se realizó la reactivación de las cepas de acuerdo al procedimiento establecido por la casa comercial. (Ver anexo 2).

- Se realiza la evaluación del medio de cultivo para verificar que es efectivo para coliformes totales, realizándose una filtración de 6 muestras adicionadas con *Pseudomona aeruginosa*, evidenciándose que no hubo crecimiento del microorganismo.

Figura 3.1 Resultado del Crecimiento de *Pseudomona aeruginosa*.



Fuente: Autor

- **Datos Obtenidos del Análisis.**

De acuerdo al esquema planteado para realizar el análisis mediante la técnica de filtración por membrana

a continuación se muestran los resultados en las diferentes tablas.

En la tabla 1. Rango Bajo, tabla 2. Rango Medio y tabla 3. Rango Alto, se observa que en las muestras de agua potable estéril sin inocular, es decir el blanco, no hay crecimiento de microorganismos en ninguno de los 3 rangos en los diferentes días y analistas, es decir que no hubo interferencias.

Tabla 1. Resultados de Ensayo de Repetibilidad y Reprodubilidad de la muestra sin inocular (blanco) – Rango Bajo.

<u>ENSAYO: REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD</u>								
Matriz : Agua Potable			Mo: E. coli					
Nivel de Inoculación: Bajo (1 - 19 UFC)								
Esquema	Día 1/ Analista 1		Día 1/ Analista 2		Día 2 / Analista 1		Día 2 / Analista 2	
	UFC	Log UFC	UFC	Log UFC	UFC	Log UFC	UFC	Log UFC
Blanco 1	0	-	0	-	0	-	0	-
Blanco 2	0	-	0	-	0	-	0	-
Blanco 3	0	-	0	-	0	-	0	-
Blanco 4	0	-	0	-	0	-	0	-
Blanco 5	0	-	0	-	0	-	0	-
Blanco 6	0	-	0	-	0	-	0	-

Fuente: Autor

Tabla 2. Resultados de Ensayo de Repetibilidad y Reprodubilidad de la muestra sin inocular (blanco) – Rango Medio.

<u>ENSAYO: REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD</u>									
Matriz : Agua Potable					Mo: E. coli				
Nivel de Inoculación: Medio (20 - 99 UFC)									
Esquema	Día 1/ Analista 1		Día 1/ Analista 2		Día 2 / Analista 1		Día 2 / Analista 2		
	UFC	Log UFC	UFC	Log UFC	UFC	Log UFC	UFC	Log UFC	
Blanco 1	0	-	0	-	0	-	0	-	-
Blanco 2	0	-	0	-	0	-	0	-	-
Blanco 3	0	-	0	-	0	-	0	-	-
Blanco 4	0	-	0	-	0	-	0	-	-
Blanco 5	0	-	0	-	0	-	0	-	-
Blanco 6	0	-	0	-	0	-	0	-	-

Fuente: Autor

Tabla 3. Resultados de Ensayo de Repetibilidad y Reprodubilidad de la muestra sin inocular (blanco) – Rango Alto.

<u>ENSAYO: REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD</u>									
Matriz : Agua Potable					Mo: E. coli				
Nivel de Inoculación: Alto (100 - 150 UFC)									
Esquema	Día 1/ Analista 1		Día 1/ Analista 2		Día 2 / Analista 1		Día 2 / Analista 2		
	UFC	Log UFC	UFC	Log UFC	UFC	Log UFC	UFC	Log UFC	
Blanco 1	0	-	0	-	0	-	0	-	-
Blanco 2	0	-	0	-	0	-	0	-	-
Blanco 3	0	-	0	-	0	-	0	-	-
Blanco 4	0	-	0	-	0	-	0	-	-
Blanco 5	0	-	0	-	0	-	0	-	-
Blanco 6	0	-	0	-	0	-	0	-	-

Fuente: Autor

En la tabla 4, tabla 5 y tabla 6 donde se realiza la comparación de las diferentes analistas, se observa

Esquema	Día 1/ Analista 1		Día 1/ Analista 2		Día 2 / Analista 1		Día 2 / Analista 2	
Muestra 1	5	0,699	5	0,699	5	0,699	5	0,699
Muestra 2	4	0,602	6	0,778	5	0,699	6	0,778
Muestra 3	5	0,699	5	0,699	4	0,602	5	0,699
Muestra 4	5	0,699	5	0,699	5	0,699	5	0,699
Muestra 5	5	0,699	4	0,602	5	0,699	5	0,699
Muestra 6	4	0,602	5	0,699	4	0,602	6	0,778
PROMEDIO	5	0,667	5	0,696	5	0,667	5	0,725
DESVIACIÓN STANDARD	---	0,046	---	0,051	---	0,046	---	0,037

Promedio Total:	5
-----------------	---

Analista 1: Marcela Cerezo
Analista 2: Silvia Salgado

que las muestras adicionadas con *Escherichia coli* cumplen con límite que se propuso para cada rango, siendo estos los siguientes:

Rango Bajo: 1 – 19 UFC

Rango Medio: 20 – 99 UFC

Rango Alto: 100 – 150 UFC

Además, los resultados obtenidos en el proceso fueron analizados por dos analistas, dos días distintos sin que sus resultados reporten desviaciones estándar con amplias diferencias.

Tabla 4. Comparación de los resultados obtenidos por diferentes analistas en el proceso de filtración por membrana – Rango Bajo

Fuente: Autor

Tabla 5. Comparación de los resultados obtenidos por diferentes analistas en el proceso de filtración por membrana – Rango Medio.

Esquema	Día 1/ Analista 1		Día 1/ Analista 2		Día 2 / Analista 1		Día 2 / Analista 2	
Muestra 1	65	1,813	74	1,869	63	1,799	67	1,826
Muestra 2	64	1,806	60	1,778	60	1,778	69	1,839
Muestra 3	61	1,785	63	1,799	62	1,792	63	1,799
Muestra 4	69	1,839	75	1,875	68	1,833	70	1,845
Muestra 5	71	1,851	72	1,857	63	1,799	72	1,857
Muestra 6	67	1,826	76	1,881	60	1,778	65	1,813
PROMEDIO	66	1,820	70	1,843	63	1,797	68	1,830
DESVIACIÓN STANDARD	--	0,022	--	0,040	--	0,018	--	0,020

Promedio Total:	67
-----------------	-----------

Analista 1: Marcela Cerezo
Analista 2: Silvia Salgado

Fuente: Autor

Tabla 6. Comparación de los resultados obtenidos por diferentes analistas en el proceso de filtración por membrana – Rango Alto.

Esquema	Día 1/ Analista 1		Día 1/ Analista 2		Día 2 / Analista 1		Día 2 / Analista 2	
Muestra 1	110	2,041	113	2,053	107	2,029	106	2,025
Muestra 2	112	2,049	108	2,033	105	2,021	113	2,053
Muestra 3	110	2,041	114	2,057	112	2,049	114	2,057
Muestra 4	118	2,072	113	2,053	114	2,057	123	2,090
Muestra 5	120	2,079	115	2,061	120	2,079	120	2,079
Muestra 6	123	2,090	128	2,107	118	2,072	118	2,072
PROMEDIO	116	2,062	115	2,061	113	2,051	116	2,063
DESVIACIÓN STANDARD	--	0,019	--	0,023	--	0,021	--	0,021
Promedio Total: 115								
Analista 1: Marcela Cerezo								
Analista 2: Silvia Salgado								

Fuente: Autor

- **Análisis Estadístico de los datos.**

La tabla 7, es el resultado de realizar un análisis estadístico ANOVA realizado en Microsoft Excel. Se utilizó los datos de los analistas 1 y 2 los Log 10 de los UFC.

Tabla 7. Análisis de Varianza de una muestra filtrada por membrana, por dos analistas en condiciones diferentes de tiempo.

Análisis de Varianza de muestra con E. coli ATCC 11229					
Rango Bajo (1 - 19 UFC)	Origen de las variaciones	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	F Calculado	Valor Crítico F
	Entre Grupos	0,014	3	1,93	3,1
	Dentro de los grupos	0,049	20		
	Total	0,063	23		
Rango Medio (20 - 99 UFC)	Origen de las variaciones	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	F Calculado	Valor Crítico F
	Entre Grupos	0,007	3	2,81	3,1
	Dentro de los grupos	0,017	20		
	Total	0,024	23		
Rango Alto (100 - 150 UFC)	Origen de las variaciones	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	F Calculado	Valor Crítico F
	Entre Grupos	0,001	3	3,04	3,1
	Dentro de los grupos	0,01	20		
	Total	0,011	23		

A aplicar el análisis de varianza es posible determinar la reproducibilidad del método, ya que se comparan los valores críticos de distribución F calculada contra el valor teórico.

Para este caso los valores F que se obtuvieron de las diferentes muestras con *Escherichia coli*, no superan el valor F crítico, lo cual quiere decir que el método presenta resultados similares estadísticamente cuando es realizado por diferente analista; sin que exista una variación considerable de los resultados. Es decir que los

resultados obtenidos por el método de filtración por membrana no van a depender de analista.

Precisión:

En la tabla 8 se presentan las desviaciones estándar para la repetibilidad y es el resultado de la raíz cuadrada de dentro de los grupos y para la reproducibilidad se sacó raíz cuadrada a los datos de entre los grupos.

Tabla 8. Desviación Estándar de una muestra filtrada por membrana, por dos analistas en condiciones diferentes de tiempo.

Rango	Desviación Estándar	
	Repetibilidad	Reproducibilidad
Bajo (1 - 19 UFC)	7,2	7,7
Medio (20 - 99 UFC)	1,8	1,6
Alto (100 - 150 UFC)	1,1	1,1

Fuente: Autor

Se puede analizar que los datos obtenidos cumplen satisfactoriamente con el criterio de precisión establecido por laboratorio, ya que las desviaciones estándares (tabla 8) están muy por debajo del valor objetivo de $\leq 15\%$ y Además los resultados no tienen diferencia significativa.

Por tal motivo se puede afirmar que el método de filtración por membrana para la detección de coliformes totales es repetible y reproducible.

- **Exactitud:**

La recuperación del microorganismo se obtiene del resultado estadístico el cual refleja la recuperación media de los datos obtenidos.

Tabla 9. Porcentajes de Recuperación de la Cepa *E.coli*.

Rango	Recuperación Microorganismo
Bajo (1 - 19 UFC)	103
Medio (20 - 99 UFC)	95
Alto (100 - 150 UFC)	96

Fuente: Autor

De acuerdo a la tabla 9, podemos ver que se cumple con el objetivo planteado de que la recuperación sea mínimo el 70 %. Ver en anexos 6, 7 y 8 las tablas de recuperación media (R_m) de donde se obtienen estos resultados.

- **Intervalo de Trabajo :**

El intervalo de trabajo se mantiene durante toda la validación sin cambios.

Rango Bajo: 1 – 19 UFC

Rango Medio: 20 – 99 UFC

Rango Alto: 100 – 150 UFC

CAPÍTULO 4

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- a) Mediante la metodología aplicada se logró cumplir el objetivo principal que consistió en Validar el método detección de coliformes totales en muestras de agua potable, utilizando el caldo m – Endo, mediante la técnica de filtración por membrana.

- b) Al establecer la reproducibilidad y la repetibilidad del método, se demuestra que no hay diferencias significativas entre los valores de las medias obtenidas por cada analista, lo que muestra que el método evaluado es repetible y reproducible, es decir preciso, y que los resultados no van a diferir si el método es realizado por

el mismo analista el mismo día o por analistas diferentes en días diferentes, cumpliendo con el objetivo de obtener una precisión $\leq 15\%$.

- c) La exactitud del método se determinó comparando la recuperación del microorganismo en cada uno de los rangos validados, donde se obtuvo que el microorganismo es recuperado en un valor $> 70\%$.
- d) Se verificó que el medio de cultivo m – endo coliformes es efectivo ya que permitió solo el crecimiento del microorganismo de interés.

4.2. Recomendaciones

- a) Se recomienda una vez determinados estos dos parámetros de validación (precisión y veracidad), se debería complementar con la determinación del límite de detección para asegurar resultados plenamente confiables.
- b) Se hace indispensable que las personas que ejecuten dicho método deben contar con el suficiente conocimiento y destreza para la ejecución correcta de la técnica de filtración por membrana.

BIBLIOGRAFÍA

1. NORMA INEN 1108. Agua Potable. Requisitos. Cuarta edición, 2014.
2. JAIRO ALBERTO ROMERO ROJAS. Calidad del Agua. Tercera edición, 2009. Editorial Escuela Colombiana de Ingeniería.
3. ARIZONA DEPARTAMENTO DE CALIDAD AMBIENTAL. 2010. Calidad de Agua. <http://www.azdeq.gov/ambiente/agua/index.html>.
4. MARIA LUISA CAMARÓ – SALAS. Validación y Verificación analítica de los métodos microbiológicos. Agosto 2010.
5. METODO ESTANDAR PARA EL ANALISIS DE AGUAS Y AGUAS RESIDUALES, Edición 22, Capitulo 9222 B.
6. ASOCIACIÓN AMERICANA PARA LA ACREDITACIÓN DE LABORATORIOS (A2LA). Guía para calcular la incertidumbre de los métodos de recuento microbiológico. Septiembre 2013.
7. FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS. Validación de Métodos Microbiológicos. Capítulo 1227. Edición 38.

ANEXOS

Anexo 1 Ficha Técnica del Medio de cultivo

Descripción	
Descripción	Caldo m-Endo para coliformes totales
Información del producto	
Tipo de ensayo	Carga biológica Límites microbiológicos
Aplicaciones	
Aplicación	Para la detección de coliformes totales en agua potable.
Aplicaciones clave	Cerveza Agua embotellada Sidra Análisis medioambientales Alimentos y bebidas CC industrial Refrescos Bebidas para deportistas Análisis y control del agua Vino
Información biológica	
Aspecto del microorganismo	Las colonias de coliformes son de color rojo oscuro con un brillo verde metálico distintivo

Información biológica	
Organismos de control de calidad	<i>E. coli</i> (ATCC 25922) mixed culture (<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> and <i>P. vulgaris</i>)
Microorganismos seleccionados	Coliformes Totales
Temperatura de incubación	35 °C ± 0.5
Tiempo de incubación	24 horas ± 2
Color del medio	Rosa a púrpura claro con ligeros precipitados
Forma de los medios	Líquido
Información fisicoquímica	
pH a 25 °C	pH7.2 ± 0.2
Declaraciones de uso del producto	
Cumplimiento de las normas	Método Estándar para análisis de aguas y aguas residuales.

Anexo 2 Reactivación de Cepa de Referencia


Kwik-Stik™ devices contain a lyophilized pellet of a single strain of microorganism or a defined mixed population of microorganisms. The selection of KWIK-STIK™ microorganisms supports quality assurance programs in microbiology laboratories providing clinical diagnostic services and a wide variety of testing services.

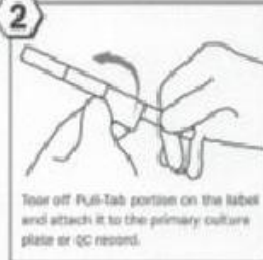



KWIK-STIK™

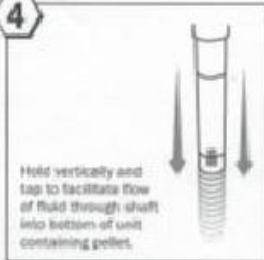
Also for KWIK-STIK™ Plus & EZ-COMPT™


Simply Efficient


- 

1 Tear open pouch at notch and remove the Kwik-Stik™.
- 


2 Tear off Pull-Tab portion on the label and attach it to the primary culture plate or QC record.
- 

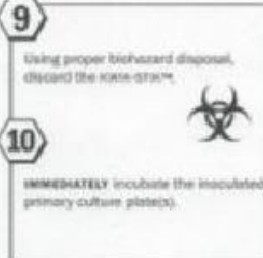
3 Pinch the bottom of the ampule in the cap to release the hydrating fluid.
- 

4 Hold vertically and tap to facilitate flow of fluid through shaft into bottom of unit containing pellet.
- 

5 Crush the pellet and mix in fluid using a pinching action.
- 

6 IMMEDIATELY saturate swab in hydrated suspension.
- 

7 Inoculate the primary culture plate(s) by using pressure and rolling the swab in a circular area approximately 25 mm in diameter.
- 

8 Using a sterile loop, streak through the inoculated area approximately 10-20 times and streak to facilitate colony isolation.
- 

9 Using proper biohazard disposal, discard the Kwik-Stik™.
- 

10 IMMEDIATELY incubate the inoculated primary culture plate(s).

MicroBioLogics

Anexo 3 Análisis de Varianza Anova - Rango Bajo.

VALIDACIÓN DE RECUENTO DE COLIFORMES TOTALES

Análisis de Varianza (ANOVA)

Matriz: Agua Potable

Rango Bajo

Mo : E. coli

Tabla I. Resultados experimentales

	Log UFC / ml			
	Grupos			
	I	II	III	IV
placa 1	0,699	0,699	0,699	0,699
placa 2	0,602	0,778	0,699	0,778
placa 3	0,699	0,699	0,602	0,699
placa 4	0,699	0,699	0,699	0,699
placa 5	0,699	0,602	0,699	0,699
placa 6	0,602	0,699	0,602	0,778
\bar{x}	0,67	0,70	0,67	0,73
s	0,05	0,06	0,05	0,04
s ²	0,003	0,003	0,003	0,002
n	5	5	5	5
ns ²	0,01	0,02	0,01	0,01

Donde x = el resultado experimental

p = 4
n = 6

Fuente de variación	Suma de cuadrados (SS)	Grados de libertad (n)	Cuadrado medio (MS)
Entre-grupos SS _e	SS _e = SS _t - SS _d	n _e = p-1	MS _e = SS _e / n _e
Dentro-grupos SS _d	SS _d = Σ n _i s _i ²	n _d = p(n-1)	MS _d = SS _d / n _d
Total SS _t	SS _t = n _t s _t ²	n _t = p n-1	-

Tabla II. Cálculo de los cuadrados medios entre-grupos y dentro-grupos

Muestra	Fuente de variación	Suma de cuadrados (SS)	Grados de libertad (n)	Cuadrado medio (MS)
Agua Potable	Entre-grupos SS _e	0,014	3	MS _e = 0,005
	Dentro-grupos SS _d	0,049	20	MS _d = 0,002
	Total SS _t	0,063	23	

El cuadrado medio, MS_e and MS_d, son comparados para determinar si MS_e es significativamente mayor que MS_d. Es decir, si hay una diferencia estadísticamente significativa entre-grupos. Para esto, se usa la prueba-F. Siendo s_d, s_e and s_t las desviaciones estándares entre-grupos, dentro-grupos y total respectivamente, se

$$s_d^2 = MS_d \quad s_e^2 = (MS_e - MS_d) / n \quad s_t^2 = s_e^2 + s_d^2$$

Tabla III. Prueba de significación y cálculo de varianzas

Muestra	F=MSe/MSd F _{calculado}	F _{0,05} F _{crítico}	p-value α = 0.05	Significación estadística?	s _d ²	s _e ²	s _t ²
Agua Potable	1,93	3,10	1,57E-01	No	0,002	0,000	0,003

If F > F_{0.05}, existe una razonable evidencia de una real variación entre-grupos

If F < F_{0.05}, es usual considerar que la variación entre-grupos no es significativa

Incertidumbre expandida (U) de la medición basada en la precisión intermedia

Tabla IV. Cálculo de la incertidumbre estándar (u_p), media y incertidumbre expandida (U)

Muestra	s _d	s _e	u _p	media (\bar{x})	U	RSD _{IR}	RSD _{Ir}
Agua Potable	0,050	0,020	0,053	0,69	0,106	0,077	0,072

Anexo 4 Análisis de Varianza Anova - Rango Medio.

VALIDACIÓN DE RECUENTO DE COLIFORMES TOTALES

Análisis de Varianza (ANOVA)

Matriz: Agua Potable

Rango Medio

Mo : E. coli

Tabla I. Resultados experimentales

	Log UFC / ml			
	Grupos			
	I	II	III	IV
placa 1	1,813	1,869	1,799	1,826
placa 2	1,806	1,778	1,778	1,839
placa 3	1,785	1,799	1,792	1,799
placa 4	1,839	1,875	1,833	1,845
placa 5	1,851	1,857	1,799	1,857
placa 6	1,826	1,881	1,778	1,813
\bar{x}	1,82	1,84	1,80	1,83
s	0,02	0,04	0,02	0,02
s ²	0,001	0,002	0,000	0,000
n	5	5	5	5
ns ²	0,00	0,01	0,00	0,00

Donde x = el resultado experimental

p = 4
n = 6

Fuente de variación	Suma de cuadrados (SS)	Grados de libertad (n)	cuadrado medio (MS)
Entre-grupos SS _e	SS _e = SS _t - SS _d	n _e = p-1	MS _e = SS _e / n _e
Dentro-grupos SS _d	SS _d = Σ n _i s _i ²	n _d = p(n-1)	MS _d = SS _d / n _d
Total SS _t	SS _t = Σ n _i s _i ²	n _t = p n-1	-

Tabla II. Calculo de los cuadrados medios entre-grupos y dentro-grupos

Muestra	Fuente de variación	Suma de cuadrados (SS)	Grados de libertad (n)	Cuadrado medio (MS)
Agua Potable	Entre-grupos SS _e	0,007	3	MS _e = 0,002
	Dentro-grupos SS _d	0,017	20	MS _d = 0,001
	Total SS _t	0,024	23	

El cuadrado medio, MS_e and MS_d, son comparados para determinar si MS_e es significativamente mayor que MS_d.

Es decir, si hay una diferencia estadísticamente significativa entre-grupos. Para esto, se usa la prueba-F

Siendo s_d, s_e and s_t las desviaciones estándares entre-grupos, dentro-grupos y total respectivamente, se tiene que:

$$s_d^2 = MS_d \quad s_e^2 = (MS_e - MS_d) / n \quad s_t^2 = s_e^2 + s_d^2$$

Tabla III. Prueba de significación y cálculo de varianzas

Muestra	F=MSe/MSd	F _{0.05}	p-value	Significación estadística?	s _d ²	s _e ²	s _t ²
	F _{calculado}	F _{critico}	a = 0.05				
Agua Potable	2,81	3,10	6,60E-02	No	0,001	0,000	0,001

If F > F_{0.05}, existe una razonable evidencia de una real variación entre-grupos

If F < F_{0.05}, es usual considerar que la variación entre-grupos no es significativa

Incertidumbre expandida (U) de la medición basada en la precisión intermedia

Tabla IV. Calculo de la incertidumbre estándar (u_p), media y incertidumbre expandida (U)

Muestra	s _d	s _e	u _p	media()	U	RSD _{IR}	RSD _{IF}
Agua Potable	0,029	0,016	0,033	1,82	0,066	0,018	0,016

Anexo 5 Análisis de Varianza Anova - Rango Alto.

VALIDACIÓN DE RECUENTO DE COLIFORMES TOTALES

Análisis de Varianza (ANOVA)

Matriz: Agua Potable

Rango Alto

Mo : E. coli

Tabla I. Resultados experimentales

	Log UFC / ml			
	Grupos			
	I	II	III	IV
placa 1	2,041	2,053	2,029	2,025
placa 2	2,049	2,033	2,021	2,053
placa 3	2,041	2,057	2,049	2,057
placa 4	2,072	2,053	2,057	2,090
placa 5	2,079	2,061	2,079	2,079
placa 6	2,090	2,107	2,072	2,072
\bar{x}	2,06	2,06	2,05	2,06
s	0,02	0,02	0,02	0,02
s ²	0,000	0,001	0,001	0,001
n	5	5	5	5
ns ²	0,00	0,00	0,00	0,00

Donde x = el resultado experimental

p = 4
n = 6

Fuente de variación	Suma de cuadrados (SS)	Grados de libertad (n)	cuadrado medio (MS)
Entre-grupos SS _e	SS _e = SS _t - SS _d	n _e = p - 1	MS _e = SS _e / n _e
Dentro-grupos SS _d	SS _d = Σ n _i s _i ²	n _d = p (n - 1)	MS _d = SS _d / n _d
Total SS _t	SS _t = n _t s _t ²	n _t = p n - 1	-

Tabla II. Cálculo de los cuadrados medios entre-grupos y dentro-grupos

Muestra	Fuente de variación	Suma de cuadrados (SS)	Grados de libertad (n)	Cuadrado medio (MS)
Agua Potable	Entre-grupos SS _e	0,001	3	MS _e = 0,000
	Dentro-grupos SS _d	0,010	20	MS _d = 0,001
	Total SS _t	0,011	23	

El cuadrado medio, MS_e and MS_d, son comparados para determinar si MS_e es significativamente mayor que MS_d.

Es decir, si hay una diferencia estadísticamente significante entre-grupos. Para esto, se usa la prueba-F

Siendo s_d, s_e and s_t las desviaciones estándares entre-grupos, dentro-grupos y total respectivamente, se tiene que

$$s_d^2 = MS_d \quad s_e^2 = (MS_e - MS_d) / n \quad s_t^2 = s_e^2 + s_d^2$$

Tabla III. Prueba de significación y cálculo de varianzas

Muestra	F=MSd/MSe F _{calculado}	F _{0.05} F _{crítico}	p-value a = 0.05	Significación estadística?	s _d ²	s _e ²	s _t ²
Agua Potable	3,04	3,10	5,26E-02	No	0,001	0,000	0,001

* MS_b<MS_w In this case MS_w is divided by MS_b to give the variance ratio F.

If F > F_{0.05} the method and technique should be subjected to a critical scrutiny to reveal any abnormal source of error

Incertidumbre expandida (U) de la medición basada en la precisión intermedia

Tabla IV. Cálculo de la incertidumbre estándar (u_p), media y incertidumbre expandida (U)

Muestra	s _d	s _e	u _p	media()	U	RSD _{IR}	RSD _{IF}
Agua Potable	0,023	0,000	0,023	2,06	0,046	0,011	0,011

Anexo 6. Ensayo de Recuperación – Rango Bajo

Ensayo de Recuperación

Tabla I. Resultados experimentales

Matriz: Agua Potable

Rango Bajo

Mo : E. coli

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
Test 1	0,00	0,00	0,00	0,00						
Test 2	0,00	0,00	0,00	0,00						
Test 3	0,00	0,00	0,00	0,00						
Test 4	0,00	0,00	0,00	0,00						
Test 5	0,00	0,00	0,00	0,00						
Test 6	0,00	0,00	0,00	0,00						
Test 1	5	5	5	5						
Test 2	4	6	5	6						
Test 3	5	5	4	5						
Test 4	5	5	5	5						
Test 5	5	4	5	5						
Test 6	4	5	4	6						
s	0,52	0,63	0,52	0,52						
s ²	0,27	0,40	0,27	0,27						
n	5	5	5	5						
ns ²	1,33	2,00	1,33	1,33						
Spike (surrogate) =	5,00 UFC									
Spike recovery=	4,92 UFC									

Table II. Factor de recuperación

	GRUPO									
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
Test 1	1,00	1,00	1,00	1,00						
Test 2	0,80	1,20	1,00	1,20						
Test 3	1,00	1,00	0,80	1,00						
Test 4	1,00	1,00	1,00	1,00						
Test 5	1,00	0,80	1,00	1,00						
Test 6	0,80	1,00	0,80	1,20						

Donde x = el resultado experimental

p = 4
n = 6

Tabla III. Cálculo del factor de corrección (R_m) y su incertidumbre estándar, $u(R_m)$

Muestra	R_m	C_{obs}	C_{corr}	t_{calc}	$t_{0.05}$	Signif.	$u(R_m)$
Matriz: Agua Potable	0,983	4,92	5,00	0,70	2,07	No	0,0238

Anexo 7. Ensayo de Recuperación – Rango Medio

Ensayo de Recuperación

Tabla I. Resultados experimentales

Matriz: Agua Potable

Rango Medio

Mo : E. coli

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
Test 1	0,00	0,00	0,00	0,00						
Test 2	0,00	0,00	0,00	0,00						
Test 3	0,00	0,00	0,00	0,00						
Test 4	0,00	0,00	0,00	0,00						
Test 5	0,00	0,00	0,00	0,00						
Test 6	0,00	0,00	0,00	0,00						
Test 1	65	74	63	67						
Test 2	64	60	60	69						
Test 3	61	63	62	63						
Test 4	69	75	68	70						
Test 5	71	72	63	72						
Test 6	67	76	60	65						
s	3,60	6,78	2,94	3,33						
s ²	12,97	46,00	8,67	11,07						
n	5	5	5	5						
ns ²	64,83	230,00	43,33	55,33						
Spike (surrogate) =	65,00 UFC									
Spike recovery=	66,63 UFC									

Table II. Factor de recuperación

	GRUPO									
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
Test 1	1,00	1,14	0,97	1,03						
Test 2	0,98	0,92	0,92	1,06						
Test 3	0,94	0,97	0,95	0,97						
Test 4	1,06	1,15	1,05	1,08						
Test 5	1,09	1,11	0,97	1,11						
Test 6	1,03	1,17	0,92	1,00						

Donde x = el resultado experimental

p = 4
n = 6

Tabla III. Cálculo del factor de corrección (R_m) y su incertidumbre estándar, $u(R_m)$

Muestra	R_m	C_{obs}	C_{corr}	t_{calc}	$t_{0.05}$	Signif.	$u(R_m)$
Matriz: Agua Potable	1,025	66,63	65,00	1,61	2,07	No	0,0155

Anexo 8. Ensayo de Recuperación – Rango Alto

Ensayo de Recuperación

Tabla I. Resultados experimentales

Matriz: Agua Potable

Rango Alto

Mo : E. coli

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
Test 1	0,00	0,00	0,00	0,00						
Test 2	0,00	0,00	0,00	0,00						
Test 3	0,00	0,00	0,00	0,00						
Test 4	0,00	0,00	0,00	0,00						
Test 5	0,00	0,00	0,00	0,00						
Test 6	0,00	0,00	0,00	0,00						
Test 1	110	113	107	106						
Test 2	112	108	105	113						
Test 3	110	114	112	114						
Test 4	118	113	114	123						
Test 5	120	115	120	120						
Test 6	123	128	118	118						
s	5,58	6,74	5,92	6,02						
s ²	31,10	45,37	35,07	36,27						
n	5	5	5	5						
ns ²	155,50	226,83	175,33	181,33						
Spike (surrogate) =	120,00 UFC									
Spike recovery=	114,75 UFC									

Table II. Factor de recuperación

	GRUPO									
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
Test 1	0,92	0,94	0,89	0,88						
Test 2	0,93	0,90	0,88	0,94						
Test 3	0,92	0,95	0,93	0,95						
Test 4	0,98	0,94	0,95	1,03						
Test 5	1,00	0,96	1,00	1,00						
Test 6	1,03	1,07	0,98	0,98						

Donde x = el resultado experimental

p = 4
n = 6

Tabla III. Cálculo del factor de corrección (R_m) y su incertidumbre estándar, $u(R_m)$

Muestra	R_m	C_{obs}	C_{corr}	t_{calc}	$t_{0,05}$	Signif.	$u(R_m)$
Matriz: Agua Potable	0,956	114,75	120,00	4,43	2,07	Yes	0,0099