



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA QUÍMICA

VALIDACIÓN DEL MÉTODO NMP PARA
COLIFORMES FECALES EN AGUA DE CONSUMO
DEL LABORATORIO AMBIENLAB.

Trabajo de Titulación

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar el grado académico de:

QUÍMICA

AUTOR: JOHANNA ESTEFANÍA SAMBACHI CHACÓN

DIRECTOR: MAGDY MILENI ECHEVERRIA GUADALUPE PhD.

Riobamba – Ecuador

2021

©2021, Johanna Estefanía Sambachi Chacón

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor

Yo JOHANNA ESTEFANÍA SAMBACHI CHACÓN, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y los resultados mismo son anteriores. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autora asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación; el patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 23 de abril de 2021



Johanna Estefanía Sambachi Chacón

C.C. 1723171755

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA QUÍMICA

El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que: El trabajo de titulación; tipo: Proyecto de investigación “**VALIDACIÓN DEL MÉTODO NMP PARA COLIFORMES FECALES EN AGUA DE CONSUMO DEL LABORATORIO AMBIENLAB.**”, realizado por la señorita: **JOHANNA ESTEFANÍA SAMBACHI CHACÓN**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del trabajo de titulación, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

	FIRMA	FECHA
Dra. Rafaela Viteri PRESIDENTE DEL TRIBUNAL	 <small>Firmado electrónicamente por:</small> MARIA RAFAELA VITERI UZCATEGUI	2021-10-05
Dra. Magdy Echeverria Guadalupe PhD. DIRECTORA DE TRABAJO DE TITULACIÓN	 <small>Firmado electrónicamente por:</small> MAGDY MILENI ECHEVERRIA GUADALUPE	2021-10-05
Dr. Robert Cazar PhD. MIEMBRO DEL TRIBUNAL	 <small>Firmado electrónicamente por:</small> ROBERT ALCIDES CAZAR RAMIREZ	2021-10-05

DEDICATORIA

A mis padres por su apoyo incondicional por ser ejemplo de perseverancia y dedicación, a mis hermanos por siempre tener una palabra de aliento a la distancia, a mi hijo por darme la fuerza para siempre superarme y a toda mi familia.

Johanna

AGRADECIMIENTO

A mis padres por todos los sacrificios que han hecho para que en el transcurso de la carrera y de toda mi vida nunca falte nada; por ser el ejemplo de trabajo, responsabilidad y esfuerzo, que han sido valores fundamentales para hoy llegar a culminar mi carrera y dar un paso más en mi superación personal.

A mis hermanos por ser parte fundamental, Oscar por ser el mejor ejemplo de hermano mayor de profesional y de hijo, para que todos los que te seguimos sepamos que queremos llegar a ser igual que tú, a mi Sofy y Joshep por sus abrazos y cariño que siempre fueron muy valiosos para que la lejanía no sea tan dura.

A mi hijo Nicolas por ser mi fuerza y motivación desde que llego para terminar la meta tan anhelada.

A mi abuelita Zoilita por todo el amor por sus caricias y mimos.

A toda mi familia por sus palabras sabias en el momento exacto y la ayuda con mi hijo miles de gracias.

Al laboratorio AMBIENLAB, en especial Ing. Jessica Vilañez por trabajar conjuntamente, enseñarme y guiarme para lograr culminar este trabajo.

A mi tutora Dra. Magdy Echeverria por el apoyo y recursos brindados para el desarrollo de mi proyecto de titulación.

Johanna

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	iix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE ANEXOS	xi
RESUMEN.....	xii
SUMMARY	xiii

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL.....	1
1.1. Planteamiento del problema	1
1.1.1. <i>Enunciado del problema</i>.....	1
1.2. Justificación.....	1
1.3. Objetivos de la investigación.....	2
1.3.1. <i>Objetivo General</i>.....	2
1.3.2. <i>Objetivos Específicos</i>	2
1.4. Marco teórico	2
1.4.1. <i>Antecedentes</i>	2
1.4.2. <i>Bases teóricas</i>.....	3
1.4.2.1. <i>El agua</i>.....	3
1.4.2.2. <i>Métodos clásicos empleados en la identificación y enumeración de coliformes</i>.....	8
1.5. Bases conceptuales	10
1.6. Base Legal.....	11

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO.....	12
2.1. Lugar de realización del Estudio.....	12
2.2. Tipo de Investigación.....	12
2.3. Diseño de la investigación	13
2.3.1. <i>Identificaciones variables</i>	13
2.3.2. <i>Planteamiento de la hipótesis</i>	13

2.4.	Matriz de consistencia.....	13
2.5.	Operacionalización de las variables.....	14
2.6.	Selección del método de Referencia.....	15
2.6.1.	<i>Coliformes fecales</i>	15
2.7.	Selección del método de validación.....	15
2.7.1.	<i>Validación</i>	15
2.7.2.	<i>Métodos desarrollados por el laboratorio</i>	15
2.7.3.	<i>Elaboración de procedimientos y hojas de cálculo</i>	15
2.8.	Criterios de Aceptación y Rechazo.....	16
2.8.1.	<i>Límite de Detección</i>	16
2.8.2.	<i>Límite de Cuantificación</i>	16
2.8.3.	<i>Intervalo de Trabajo</i>	17
2.9.	Precisión.....	17
2.9.1.	<i>Repetibilidad</i>	17
2.9.2.	<i>Reproducibilidad</i>	17
2.9.3.	<i>Parámetros y objetivos de validación</i>	17
2.10.	Diseño Estadístico.....	18
2.10.1.	<i>ANOVA</i>	18
2.11.	Puesta a punto.....	19
2.11.1.	<i>Calibraciones Externas e internas</i>	19
2.12.	Control de ambientes.....	20
2.13.	Verificación de calidad medios de cultivo.....	20
2.13.1.	<i>Control de esterilidad</i>	20
2.13.2.	<i>Control de pH</i>	21
2.14.	Revitalización de cepas.....	21
2.15.	Preparación de inóculo.....	21
2.16.	Procedimientos coliformes fecales por el método de número más probable.....	23

CAPÍTULO III

3.	MARCO DE RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS.....	25
3.1.	Datos experimentales.....	25
3.2.1.	<i>F calculado</i>	29

3.3.	Precisión	29
3.3.1.	<i>Repetibilidad</i>	29
3.3.2.	<i>Reproducibilidad</i>	30
3.4.	Límite de cuantificación y límite de detección	30
3.4.1.	<i>Desviación estándar</i>	31
3.4.2.	<i>Límite de detección</i>	31
3.4.3.	<i>Límite de cuantificación</i>	31
DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....		32
CONCLUSIONES.....		33
RECOMENDACIONES.....		34
BIBLIOGRAFÍA		
ANEXOS		

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-2: Matriz de consistencia.....	13
Tabla 2-2: Operacionalización de las variables.....	14
Tabla 3-2: Objetivos de Validación para coliformes fecales.....	18
Tabla 4-2: Modelo para ANOVA de un factor de 3*5.....	19
Tabla 5-2: Estructura de ANOVA de un factor.....	19
Tabla 6-2: Equipos, Instrumentos y materiales.....	23
Tabla 1-3: Valores numéricos de NMP.....	25
Tabla 2-3: Valores numéricos de NMP transformados a logaritmo.....	25
Tabla 3-3: ANOVA.....	26
Tabla 4-3: Datos NMP del blanco.....	30

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-2: Ubicación laboratorio AMBIENLAB.....	11
Figura 2-2: Estándares de dilución.....	23

ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO A:** PROCEDIMIENTOS DE LOS MÉTODOS DE ENSAYO
- ANEXO B:** HOJA DE CÁLCULO PARA LA VALIDACIÓN EN EXCEL
- ANEXO C:** CERTIFICADOS DE CALIBRACIÓN DEL MULTIPARÁMETRO HACH
- ANEXO D:** CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN DEL ESPECTROFOTÓMETRO HACH
- ANEXO E:** CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN DE LA BALANZA ANALÍTICA
- ANEXO F:** MULTIPARÁMETRO HACH SONDA PARA pH
- ANEXO G:** ESPECTROFOTÓMETRO HACH DR 6000
- ANEXO H:** CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN PIPETA DE PISTÓN DE 10ML
- ANEXO I:** CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN REFRIGERADORA ÁREA DE MICROBIOLOGÍA
- ANEXO J:** CERTIFICADO DE ANÁLISIS MEDIO EC
- ANEXO K:** CERTIFICADO DE ANÁLISIS CALDO LAURIL SULFATO
- ANEXO L:** CERTIFICADO DE ANÁLISIS CEPA ATTC25922
- ANEXO M:** CERTIFICADO DE ANÁLISIS CEPA ATTC29212
- ANEXO N:** CERTIFICADO DE ANÁLISIS ESCALA MC FARLAND
- ANEXO O:** CERTIFICADO DE ANÁLISIS AGAR SANGRE DE CORDERO
- ANEXO P:** CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN INCUBADORA BIOBASE 45°C
- ANEXO Q:** PRUEBA DE HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS DE COCHRAN
- ANEXO R:** VALORES CRÍTICOS DE F DE FISHER
- ANEXO S:** DISTRIBUCIÓN T DE STUDENT
- ANEXO T:** CERTIFICADO DE CUMPLIMIENTO DE NORMATIVA

RESUMEN

El objetivo de este trabajo de titulación fue realizar la validación del método de ensayo para la determinación de coliformes fecales en agua de consumo. Esta validación fue desarrollada con base en procesos disponibles en la tercera edición del 2017 del manual de ensayos “*Standard Methods*” o SM (Traducido al español como Métodos Estandarizados) para su aplicación en el laboratorio privado AMBIENLAB Cía. Ltda, ubicado en la ciudad de Quito, Ecuador. Con la finalidad de asegurar la calidad y veracidad de los resultados en el análisis de coliformes fecales para aguas de consumo, este procedimiento siguió los procesos establecidos en la norma ISO 17025-2018 (“*Internacional Organization for Standardization*” u Organización Internacional de Normalización, en español) enfocada en laboratorios de ensayos y calibración. La metodología seleccionada fue la SM 9221 B. Una vez seleccionado el método se procede con la puesta a punto del método, la calibración externa de los equipos y fijar los objetivos de validación para iniciar con la parte experimental que consta de dos fases, una fase presuntiva y una fase confirmativa. Para su desarrollo, se plantearon los criterios de desempeño, intervalo de trabajo y diseño experimental en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad. Los resultados del analito se obtuvieron a través del tratamiento estadístico de datos ANOVA. Los objetivos de validación se establecieron de acuerdo con la normativa nacional vigente y datos experimentales de validación proporcionados por el laboratorio AMBIENLAB. De acuerdo con los resultados obtenidos, se pudo demostrar que el método es aplicable de forma competente en el laboratorio; además, se cumplió en su totalidad los objetivos de validación para el método SM9221 B, esto quiere decir que el coeficiente de repetibilidad y reproducibilidad son menores al 5% por lo que se recomienda al laboratorio AMBIENLAB realizar la verificación del método de ensayo con material de referencia certificado con una frecuencia mensual al menos en un nivel de concentración para asegurar la calidad de los resultados obtenidos.

Palabras clave: < METODOLOGÍA SM9221 B>, < NUMERO MÁS PROBABLE (NMP)>, <COLIFORMES FECALES>, <AGUA DE CONSUMO>, <CRITERIO DE ACEPTACIÓN>.

LEONARDO
FABIO MEDINA
NUSTE

Firmado digitalmente por LEONARDO
FABIO MEDINA NUSTE.
Nombre de reconocimiento (DN): c=EC,
o=BANCO CENTRAL DEL ECUADOR,
ou=ENTIDAD DE CERTIFICACION DE
INFORMACION ECIBCE, I=QUITO,
serialNumber=000021461,
cn=LEONARDO FABIO MEDINA NUSTE
Fecha: 2022.03.03 09:10:55 -05'00'



0377-DBRA-UTP-2022

SUMMARY

The objective of this titration work was to carry out the validation of the test method for the determination of fecal coliforms in drinking water. This validation was developed based on processes available in the third edition of 2017 of the test manual "Standard Methods" or SM (Translated into Spanish as Standardized Methods) for application in the private laboratory AMBIENLAB Cía. Ltda, located in the city of Quito, Ecuador. In order to ensure the quality and veracity of the results in the analysis of fecal coliforms for drinking water, this procedure followed the processes established in the ISO standard 17025-2018 ("International Organization for Standardization") focused on testing and calibration laboratories. The methodology selected was SM 9221 B. Once the method has been selected, we proceed with the set-up of the method, the external calibration of the equipment and set the validation objectives to start with the experimental part that consists of two phases, a presumptive phase and a confirmatory phase. For its development, the criteria of performance, work interval and experimental design in conditions of repeatability and reproducibility were proposed. Analyte results were obtained through statistical treatment of ANOVA data. The validation objectives were established in accordance with current national regulations and experimental validation data provided by the AMBIENLAB laboratory. According to the results obtained, it was possible to demonstrate that the method is competently applicable in the laboratory; In addition, the validation objectives for the SM9221 B method were fully met, this means that the coefficient of repeatability and reproducibility are less than 5%, so it is recommended that the AMBIENLAB laboratory carry out the verification of the test method with certified reference material with a monthly frequency at least at a concentration level to ensure the quality of the results obtained.

Keywords: SM9221 B METHODOLOGY, MOST LIKELY NUMBER (NMP), FECAL COLIFORMS, DRINKING WATER, ACCEPTANCE CRITERIA.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.1. Planteamiento del problema

1.1.1. *Enunciado del problema*

En la actualidad el laboratorio AMBIENLAB está sustentado a un ente regulador, el Servicio de Acreditación Ecuatoriana o SAE, el cual se encarga de auditar los procesos realizados por el laboratorio para que los datos proporcionados al cliente sean confiables. Para los análisis microbiológicos del agua se tiene un problema un poco más complejo debido a que no tenemos un equipo programado para lo que es la medición de coliformes fecales por lo que el método a utilizar debe ser ejecutado bajo todas las normas y siguiendo el método preestablecido para dicho análisis.

1.1.2. *Formulación (Incógnita)*

¿Cómo demostrar la fiabilidad de los resultados en la técnica de Numero Más Probable (NMP) para coliformes fecales en agua consumo según la técnica del “*Standard Methods 9221E*” o SM 9221E?

1.2. Justificación

En la actualidad los laboratorios de mediciones ambientales deben demostrar que sus resultados garanticen veracidad y fiabilidad, la validación de métodos de ensayo es un requisito que permite obtener un grado de confianza comprobable en cumplimiento con la normativa ambiental vigente.

La validación de métodos es una confirmación, a través del aporte de evidencias objetivas, que cumplen los requisitos para una utilización o aplicación específica prevista. Según la Organización de las Naciones Unidas para el Desarrollo Industrial (ONUDI), la validación es un proceso que consiste en dos etapas. Primero, el laboratorio establece en qué medida puede producir resultados consistentes dentro de unos límites conocidos (precisión, exactitud) y segundo, consiste en la evaluación a sí mismo con puntos de referencia acordados (ONUDI, 2017, pp.15-19).

El laboratorio de Servicios Ambientales y Laborales AMBIENLAB Cía. Ltda. desea ampliar su visión y brindar servicios con altos estándares de calidad en la determinación de coliformes fecales en aguas de consumo tomando en consideración la aplicación de métodos técnicamente validados por lo que brindará el sustento técnico y económico para la realización del trabajo de validación. La Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH) brindará la ayuda técnico-científico necesaria para realizar la validación del método de ensayo NMP para la determinación de coliformes fecales.

1.3. Objetivos de la investigación

1.3.1. Objetivo General

Validar el método de ensayo para la determinación de coliformes fecales en agua de consumo, en base al “*Standard Methods*” para la aplicación en el laboratorio AMBIENLAB Cía. Ltda.

1.3.2. Objetivos Específicos

- Establecer características de desempeño y criterios de aceptabilidad en conformidad a lo establecido en el “*Standard Methods*”.
- Evaluar el desempeño del método a partir del cumplimiento de los criterios de aceptación para el parámetro de validación.
- Elaborar un manual de procedimientos para la determinación de coliformes fecales por NMP.

1.4. Marco teórico

1.4.1. Antecedentes

El control de la calidad del agua ha sido prioritario principalmente en zonas urbanas, para verificar una adecuada potabilización del agua, o cuando se presentan brotes de enfermedades diarreicas en la población consumidora, donde una vez detectado el problema en el suministro de agua se resuelve a corto plazo mejorando las condiciones de desinfección de la misma (Swistock, 2015, p.54). Las coliformes son una familia de bacterias que se encuentran exclusivamente en las plantas, el suelo y los animales, incluidos los humanos. La presencia de bacterias coliformes indica que el agua puede estar contaminada con aguas negras u otro tipo de desechos en descomposición. Generalmente, las bacterias coliformes se encuentran en mayor abundancia en la capa superficial del agua o en los sedimentos del fondo (Munn, 2004, p.123). La contaminación fecal ha sido y sigue

siendo el principal riesgo sanitario en el agua, ya que supone la incorporación de microorganismos patógenos que pueden provocar enfermedades en la salud humana. Por ello, el control sanitario de riesgos microbiológicos es tan importante, y constituye una medida sanitaria básica para mantener un grado de salud adecuado en la población (Marin B, 2004, p.327).

Las bacterias coliformes fecales son específicas del tracto intestinal de los animales de sangre caliente, incluidos los humanos, y por lo tanto se requiere una prueba más específica para detectar la contaminación por aguas residuales o desechos animales. La *Escherichia coli* o simplemente *E. coli*, es un tipo de bacteria coliforme fecal que se encuentra comúnmente en los intestinos de animales y humanos. Un resultado positivo de *E. coli* es mucho más serio que las bacterias coliformes por sí solas porque indica que los desechos humanos o animales están ingresando al suministro de agua (Munn, 2004, p.123).

El laboratorio de monitoreo ambiental y laboral AMBIENLAB ha brindado desde el año 2018 un servicio de monitoreo ambiental para una variedad de industrias y organizaciones por lo que se encuentra en busca de expandir sus servicios.

Entre los requisitos técnicos establecidos en la norma ISO/IEC 17025 se encuentra la validación de métodos, es por esto que el laboratorio de monitoreo ambiental y laboral AMBIENLAB, obtuvo la acreditación INEN ISO 17025:2006, a nivel nacional por el Servicio de Acreditación Ecuatoriana (SAE) en el año 2018 (ISO 17025, 2018, p.1), con el fin de garantizar que el laboratorio analice y tenga bajo control uno de los factores que incide en la conformidad y exactitud de los resultados que informa. Actualmente el laboratorio AMBIENLAB cuenta con la acreditación en ruido laboral y busca una expansión en análisis físico-químico y microbiológico de suelos y aguas.

1.4.2. Bases teóricas

1.4.2.1. El agua

Generalidades

El agua según la Real Academia Española viene del latín “*aqua*” sus moléculas están formadas por la combinación de un átomo de oxígeno y dos de hidrógeno, líquida, inodora, insípida e incolora. Es el componente más abundante de la superficie terrestre se encuentra en la lluvia, las fuentes, los ríos y los mares; es parte constituyente de todos los organismos vivos y aparece en compuestos naturales” (RAE, 2014, p.1). En una definición propia: es una sustancia química formada por un átomo de oxígeno y dos átomos de hidrógeno, El agua es fundamental para la vida, es el componente vital de los seres vivos. El organismo humano está formado por un 70 % de agua y este planeta está constituido por un elevado porcentaje de agua, aunque no toda esa agua está presente en los océanos mayoritariamente (Pacífico, Atlántico e Indico) también se encuentra en

ríos, lagos, arroyos, glaciares, etc. es apta para el consumo humano y la que se consume es el agua dulce presente en volúmenes inferiores a las grandes masas de agua que hay en la Hidrosfera (Glynn, 1999, p.37).

Calidad del agua

La disponibilidad de agua es de gran importancia para la vida y el desenvolvimiento económico de todas las ciudades en la tierra. Los recursos disponibles deben ser repartidos entre todas las personas que habilitan el planeta además de tener en cuenta las necesidades del medio ambiente. Durante muchos años, todos los recursos eran considerados disponibles para cualquier uso antrópico, sin tener en cuenta la calidad o las necesidades para los usos ambientales. Cuando se considera la distribución del agua entre los distintos usuarios, la agricultura aparece como el sector de mayor demanda (López, 2006, p.15). Las dos terceras partes de los recursos hídricos se destinan al uso agrícola, con una demanda creciente para el turismo, usos urbanos e industriales, compitiendo por un acceso a un recurso cada vez menos disponible (Badgley BD, 2011, p.76).

El aprovisionamiento de agua para uso doméstico es el más exigente, en términos de calidad y seguridad del suministro. La calidad de agua tiene consecuencias directas en la salud humana, situación que se torna más grave por la demanda creciente (Proaño, 2017, p.48).

El agua potable es necesaria para la vida, para la salud y para una existencia productiva. La salud humana depende no sólo de la cantidad de agua suministrada, sino principalmente de la calidad. Según la OMS (Organización Mundial de la Salud), casi la cuarta parte de las camas disponibles en los hospitales del mundo están ocupadas por enfermos cuyas dolencias se deben a la insalubridad del agua (Hartl, 2002, p.25).

La Década Internacional del Agua Potable y Saneamiento de las Naciones Unidas, en los años ochenta, fue proclamada por la Conferencia del Agua de las Naciones Unidas (Mar del Plata, 1977, p.91). Se enfocó en el mejoramiento de la salud pública mediante la ampliación de la cobertura de servicios, bajo el lema: “agua y saneamiento para todos”. Si bien hubo grandes avances y las metas se reiteraron en 1990, aún quedan sectores sin acceso a agua segura y la situación es aún más crítica en lo referente a saneamiento. La población mundial asciende aproximadamente a 7000 millones, de los cuales el 20 % no bebe agua potable y el 40 % no tiene acceso a medios de saneamiento (Aqua, 2018, pp.2-18).

La Asamblea General de las Naciones Unidas, en 2010, estableció el derecho al agua potable y saneamiento como un derecho humano esencial para el pleno disfrute de la vida y de todos los derechos humanos (Fernandez, 2012, p.189).

Los criterios de calidad para agua potable han sido desarrollados tomando en cuenta el empleo de agua de primer uso o sin contaminantes tóxicos sintéticos. En las últimas tres décadas, se incrementó la preocupación por la producción, uso y destino final de numerosos productos

químicos empleados en la industria, agricultura, ganadería, medicina, etc. Las investigaciones realizadas han demostrado que estas sustancias pueden incorporarse en el medio ambiente, dispersarse y persistir en extensiones mucho más grandes que las esperadas. Algunas de ellas, como por ejemplo los agroquímicos y en particular los pesticidas, son esparcidos intencionalmente sobre vastas regiones para proteger los distintos tipos de cultivos de plagas; otras, como los subproductos industriales, son vertidas al agua o al aire de manera directa o indirecta (Bachoon DS et al., 2010, p.452).

Los productos farmacéuticos y cosméticos, son elementos importantes dentro de la vida moderna, y se emplean tanto en la medicina humana como veterinaria. Estas sustancias, se incorporan a las aguas superficiales a través de los residuos cloacales, que pueden estar o no tratados previamente, en forma directa. La eficiencia del tratamiento de las aguas residuales, no permite eliminar totalmente este tipo de compuestos; por lo tanto, pueden alcanzar las aguas superficiales con relativa facilidad (Aguilar, 2002, p.1561).

Algunos de los potenciales problemas que puede provocar esta contaminación, denominada silenciosa, son: procesos fisiológicos anormales, disminución de la capacidad de reproducción, aumentos de los casos de cáncer, desarrollo de cepas bacterianas con extremada resistencia a los antibióticos, potencial incremento de la toxicidad de los compuestos presentes en el medio ambiente por efectos sinérgicos. Los efectos pueden acumularse de manera lenta sin poder detectarse, de allí su denominación silenciosa, hasta un determinado nivel donde los efectos se evidencian y producen cambios irreversibles por efecto cascada (Fernandez, 2012, p.189).

Distribución del agua en la tierra

El 97.5% del agua en la tierra se encuentra en los océanos y mares de agua salada, únicamente el restante 2.5% es agua dulce. Del total de agua dulce en el mundo, 69% se encuentra en los polos y en las cumbres de las montañas más altas y se encuentra en un estado sólido (Glynn, 1999, p.37). El 30% del agua dulce del mundial, se encuentra en la humedad del suelo y en los acuíferos profundos (MUNN, 2004, p.97).

Solo el 1% del agua dulce en el mundo, escurre por las cuencas hidrográficas en forma de arroyos y ríos y se depositan en lagos, lagunas y en otros cuerpos superficiales de agua y en acuíferos. (Jumapam, 2019, pp.7-42).

Clasificación del agua

Si bien su definición es aplicable a cualquier forma en la que se pueda presentar, conviene aclarar que existen varios tipos de agua en función de sus características químicas, físicas o biológicas:

- Potable: aquella destinada para el consumo humano.

- Dulce: se encuentra en la superficie terrestre de manera natural, así como en ecosistemas subterráneos.
- Salada: posee una concentración de sales minerales disueltas de cerca del 35%. Se encuentra en océanos y mares.
- Salobre: tiene más sales disueltas que la dulce, pero menos que la salada.
- Dura: aquella que contiene un alto nivel de minerales disueltos.
- Blanda: en ella se encuentra disuelta una mínima cantidad de sales.
- Destilada: cuando ha sido purificada o limpiada mediante destilación.
- Residuales: cualquier tipo de agua cuya calidad está afectada negativamente por la influencia del ser humano.
- Negras: contaminadas con heces u orina.
- Grises: también conocida como agua usada, es aquella que proviene del uso doméstico.
- Cruda o bruta: no ha recibido ningún tratamiento y suele encontrarse en fuentes y reservas naturales (Aquae, 2018, pp.10-52).

Agua potable

La definición legal de agua potable consiste en proporcionar una lista de compuestos y asociarlos con un nivel tolerable. Desde el punto de vista práctico, la cantidad de sustancias seleccionadas debe ser limitada. En las legislaciones de los diferentes países se consideran entre 80 y 130 compuestos, a pesar de que se sabe que el número de compuestos sintéticos que el hombre maneja es mayor que 70.000, y para muchos de ellos se desconoce el grado de toxicidad. De esta manera, aun cuando un agua pueda cumplir con las normas de potabilización no se puede asegurar que no exista algún otro contaminante. Cabe mencionar, que los criterios de calidad para agua potable han sido desarrollados tomando en cuenta el empleo de agua de primer uso o sin contaminación por tóxicos sintéticos. El agua potable es normalmente garantizada por las autoridades, y su existencia es absolutamente esencial para asegurar la presencia de población en un lugar determinado. Existen normativas de calidad que se deben cumplir para el agua potable en todos los países y ésta no puede provenir de cualquier fuente (Fernandez, 2012, p.189).

Calidad del agua para uso y consumo humano

La calidad del agua se refiere a las Condiciones en que se encuentran Ira el agua respecto a sus características físicas, químicas y biológicas, en su estado natural o después de ser alteradas por el accionar humano. Se considera que el agua es de buena calidad cuando está exenta de sustancias y microorganismo que sean peligrosos para los consumidores y está exenta de

sustancias que transmitan sensaciones desagradables para el consumo, como el color, olor, el sabor o turbiedad (Narváez S, 2008, p.784).

Factores que determinan la calidad del agua

Se plantean tres tipos de factores que determinan la calidad del agua estos son:

Factores físicos: la calidad del agua modificada por sustancias puede no ser toxica, pero cambia el aspecto del agua, entre ellas los sólidos en suspensión. turbidez, color y la temperatura (Marin B, 2004, p.327).

Factores químicos: las actividades industriales generan contaminación al agua cuando Hay presencia de metales pesados tóxicos para los humanos tales como arsénico plomo, mercurio, cromo. La actividad agrícola contamina cuando emplea fertilizantes que son arrastrados hacia las aguas, especialmente nitratos y nitritos. Además, el uso inadecuado de plaguicidas contribuye con sustancias toxicas para los humanos (Munn, 2004, p. 123).

Factores biológicos -bacteriológicos: diversos existen organismos que contaminan el agua. Las bacterias son uno de los principales contaminantes del agua. Los coliformes son buenos indicadores microbianos de la calidad del agua También contaminan el agua virus, algas, protozoos y hongos (Carrillo E, 2008, p.784).

Microorganismos

Los microorganismos indicadores son aquellos que tienen un comportamiento similar a los patógenos en cuanto a concentración en las aguas y reacción frente a factores ambientales, pero son más fáciles, rápidos y económicos de identificar (Munn, 2004, p.97).

Indicadores de contaminación

El control de la calidad sanitaria de los recursos del ambiente puede llevarse a cabo mediante la enumeración de bacterias indicadoras de contaminación fecal. Estas bacterias pueden ser utilizadas para valorar la calidad de los alimentos, sedimentos y aguas destinadas al consumo humano, la agricultura, la industria y la recreación. No existe un indicador universal, por lo que se debe seleccionar el más apropiado para la situación específica en estudio (Bachoon DS et al., 2010, p.452).

Bacterias coliformes como indicadores de contaminación

El grupo de microorganismos coliformes es adecuado como indicador de contaminación fecal debido a que estos forman parte del microbiota normal del tracto gastrointestinal, tanto del ser humano como de los animales homeotermos y están presentes en grandes cantidades en él. Los microorganismos coliformes constituyen un grupo heterogéneo de amplia diversidad en

términos de género y especie. Todos los coliformes pertenecen a la familia Enterobacteriaceae. (Delgado et al., 2008, p.95).

Coliformes termo tolerantes

Los coliformes termo tolerantes (CTE), denominados así porque soportan temperaturas hasta de 45 ° C, comprenden un número muy reducido de microorganismos, los cuales son indicadores de calidad por su origen. En su mayoría están representados por *E. coli*, pero se pueden encontrar de forma menos frecuente las especies *Citrobacter freundii* y *Klebsiella pneumoniae*. Estas últimas forman parte de los coliformes termotolerantes, pero su origen normalmente es ambiental (fuentes de agua, vegetación y suelos) y solo ocasionalmente forman parte del microbiota normal. (Badgley BD, 2011, p.76). Por esto algunos autores plantean que el término de coliformes fecales, comúnmente utilizado, debe ser sustituido por coliformes termo tolerantes (Narváez S, 2008, p.784). Los coliformes termo tolerantes integran el grupo de los coliformes totales, pero se diferencian de estos últimos, en que son indol positivo, su intervalo de temperatura óptima de crecimiento es muy amplio (hasta 45 ° C) y son mejores indicadores de higiene en alimentos y agua. La presencia de estos microorganismos indica la existencia de contaminación fecal de origen humano o animal, ya que las heces contienen coliformes termo tolerantes que están presentes en el microbiota intestinal, siendo *E. coli* la más representativa, con un 90-100 % (Carrillo E, 2008, p.784).

1.4.2.2. Métodos clásicos empleados en la identificación y enumeración de coliformes

Técnica de fermentación en tubos múltiples

La técnica de fermentación en tubos múltiples (FTM) para enumerar coliformes se ha usado durante alrededor de 80 años como método de monitoreo de la calidad del agua. El método consiste en inocular una serie de tubos con diluciones decimales de la muestra de agua. La producción de gas, formación de ácido o abundante crecimiento en los tubos después de 48 h de incubación a 35 °C constituyen resultados presumiblemente positivos (Eckner, 1998, p.87). Todos los tubos con reacción presumiblemente positiva son inmediatamente sometidos a pruebas de confirmación. La formación de gas en caldo lactosado bilis verde brillante en los tubos de fermentación tras 48 h de incubación a 35 °C constituye una prueba de confirmación positiva. la prueba de coliformes fecales usando medio *Escherichia coli* (EC), puede aplicarse para determinar coliformes totales y fecales (Carrillo E, 2008, p.784).

la producción de gas después de 48 h de incubación a 44,5 °C en caldo EC se considera un resultado positivo. Los resultados de la técnica FTM se expresan en términos del número más probable (NMP) de microorganismos presentes. Este número se estima estadísticamente del número medio de coliformes en la muestra. Como consecuencia de lo anterior, esta técnica ofrece

una enumeración semicuantitativa de coliformes y la precisión de la estimación es bastante baja y depende del número de tubos usados para el análisis. Esta técnica carece de precisión en términos cualitativos y cuantitativos y el tiempo requerido para obtener los resultados es mayor que el necesario cuando se utiliza la técnica de filtración por membrana (FM), la cual ha reemplazado en muchos casos a la técnica de FTM debido a la sistematicidad de los exámenes de agua potable, sin embargo, la FTM resulta muy útil cuando se analizan muestras muy turbias o coloreadas en las cuales no es posible utilizar la filtración por membrana (Román, 2018, p.5).

ESTÁNDAR METHODS, 9221 Técnica de fermentación de tubo múltiple para miembros del grupo coliforme

La definición histórica de este grupo se ha basado en el método utilizado para detección, fermentación de lactosa, más que en los principios de bacteriología sistemática. En consecuencia, cuando se utiliza esta técnica, este grupo se define como todas las bacterias anaeróbicas facultativas, gramnegativas, no formadoras de esporas y con forma de bastoncillo que fermentan la lactosa con la formación de gas y ácido dentro de las 48 h en 35 ° C (Baird, et al., 2017, p.934).

La prueba estándar para el grupo de coliformes puede ser realizada por la técnica de fermentación de múltiples tubos o presencia-ausencia procedimiento (a través de las fases presuntamente confirmadas o prueba completada) que se describe a continuación (Baird, et al., 2017, p.934).

La densidad de coliformes se puede estimar utilizando un método más probable tabla de números (MPN). Este número, basado en cierta probabilidad fórmulas, es una estimación de la densidad media de coliformes en la muestra (PA, 1996, p.127).

1.4.2.3. AmbienLab Cia. Ltda.

Es una empresa privada legalmente constituida que brinda servicios ambientales y laborales son una organización que se dedica a ofrecer servicios de monitoreos ambientales y laborales de aire, ruido, gases, aguas y suelos (Ambienlab, 2018, pp.1-43).

MISIÓN

Brindar servicios de monitoreos ambientales y laborales de aire, ruido, gases, aguas y suelos, con altos estándares de calidad a diferentes actividades, obras o proyectos Públicos, Privados o Mixtos, de conformidad con la legislación vigente (Ambienlab, 2018, pp.1-43).

VISIÓN

Ser un Laboratorio Ambiental y Laboral líder en la prestación de servicios con reconocimientos a nivel nacional e internacional por sus altos estándares de calidad en toda la gama de servicios ofertados (Ambienlab, 2018, pp.1-43).

ÉTICA

Nuestro Código de Ética empresarial, nos permite un proceder digno, establecido por nuestras convicciones y demostrando la rectitud de nuestros actos (Ambienlab, 2018, pp.1-43).

POLÍTICA DE IMPARCIALIDAD Y CONFIDENCIALIDAD

Garantizamos que la información y documentación de nuestros clientes sea sólo para aquellos autorizados a tener acceso (Ambienlab, 2018, pp.1-43).

1.5. Bases conceptuales

- **Validación:** validar un método es básicamente el proceso para definir un requisito analítico, y la confirmación de que cuenta con capacidades consistentes con las aplicaciones requeridas. Inherente a esto está la necesidad de evaluar el desempeño del método. Es importante la valoración de la idoneidad del método (Örmark, 2016, p.645).
- **El agua:** es un recurso renovable pero finito, cubre más del 70 % de la superficie del planeta; se la encuentra en océanos, lagos, ríos; en el aire, en el suelo. Es la fuente y el sustento de la vida, contribuye a regular el clima del mundo y con su fuerza formidable modela la Tierra. Posee propiedades únicas que la hacen esencial para la vida. Es un material flexible: un solvente extraordinario, un reactivo ideal en muchos procesos metabólicos; tiene una gran capacidad calorífica (Agudelo, 2005, p.453).
- **Agua de consumo:** Es el agua cuyas características físicas, químicas microbiológicas y han sido tratadas a fin de garantizar su aptitud para consumo humano (INEN 1108, 2011, p.47).
- **Coliformes fecales:** Las bacterias coliformes fecales constituyen un conjunto de especies bacterianas que tienen características específicas. Estos organismos se consideran indicadores de contaminación del agua y alimentos, son fermentadores de lactosa (PA, 1996, p.127).
- **Número Más Probable (NMP):** Emplea diluciones sucesivas de la muestra y análisis estadísticos para alcanzar un punto de extinción. Es una estrategia eficiente de estimación de densidades poblacionales especialmente cuando una evaluación cuantitativa de células individuales no es factible. Esta técnica se basa en la determinación de presencia o ausencia en réplicas de diluciones consecutivas de atributos particulares de microorganismos presentes en muestras de agua (Eckner, 1998, p.87).
- **NMP:** Forma de expresión de parámetros microbiológicos, número más probable, cuando se aplica la técnica de los tubos múltiples (Baird, et al., 2017, p.934).
- **Criterio de aceptación:** son aquellos criterios, incluidos los requisitos de rendimiento y las condiciones esenciales, que deben cumplirse (Armenteros, 2007, pp.89-95).

1.6. Base Legal

El análisis del agua potable se llevará a cabo bajo los requisitos impuestos por la normativa NTE INEN 1108 (2011, pp.2-47) sobre Agua Potable en la cual nos da a conocer los límites máximos permitidos de coliformes fecales en el agua de consume y el tipo de técnica que se debe utilizar para el análisis (INEN 1108, 2011, pp.2-47).

La norma INTE-ISO / IEC-17025: 2005 "Requerimientos para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración", que le permitirán demostrar al Laboratorio de Microbiología de Aguas la competencia técnica en su realización (ISO 17025, 2018, pp.1-10).

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1. Lugar de realización del Estudio

La investigación se realizará en el laboratorio Ambienlab Cia. Ltda. Ubicada en la ciudad de Quito en las calles Juan González N35-26 y Juan Pablo Sanz Edificio Torres Vizcaya II. Torre norte piso 2, oficina 2B.

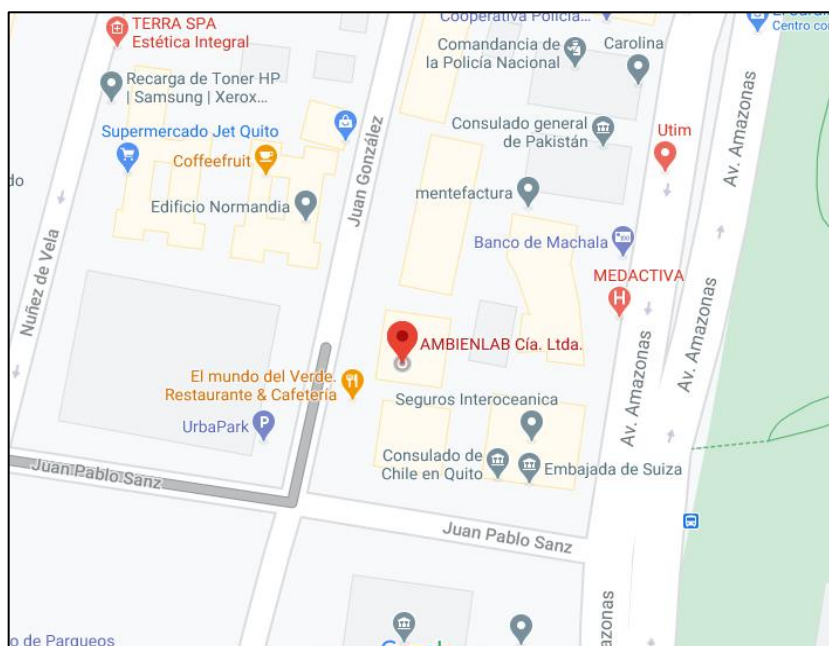


Figura 1-2. Ubicación laboratorio AMBIENLAB

Realizado por: Sambachi Johanna, 2021.

2.2. Tipo de Investigación

-Por el método de investigación: cuantitativa porque permite examinar los datos de manera numérica especialmente en el campo de la estadística.

-Según el objetivo: aplicada; según el objetivo la definimos como aplicada debido a que tiene por objetivo resolver un determinado problema o planteamiento específico, enfocándose en la búsqueda y consolidación del conocimiento para su aplicación

-Según el nivel de profundización en el objeto de estudio: explicativo; Se busca no solo el qué sino el porqué de las cosas, y cómo han llegado al estado en cuestión. Para ello pueden usarse diferentes métodos, como la el método observacional, correlacional o experimental.

-Según la manipulación de variables: Pre-Experimental; no se va a manipular las variables en condiciones altamente controladas

-Según el tipo de inferencia: hipotética-deductiva; se genera la hipótesis a partir de hechos observados mediante la inducción, que a su vez deberán ser comprobadas y falseadas mediante la experimentación.

-Según el periodo temporal: transversal; investigación se centra en la comparación de determinadas características en un tiempo determinado

-Por la condición de estudio: Campo, proceso que permite obtener datos de la realidad y estudiarlos tal y como se presentan, sin manipular las variables.

2.3. Diseño de la investigación

El diseño preexperimental que se va a llevar a cabo será analizado a continuación.

2.3.1. Identificaciones variables

a) Variables dependientes

Fiabilidad de los resultados de la técnica de NMP para coliformes fecales en agua consumo

b) Variables independientes

Técnica de métodos estandarizados SM 9221E.

2.3.2. Planteamiento de la hipótesis

Los resultados en la técnica de NMP son fiables para la determinación de coliformes fecales en agua de consumo determinados en el manual de procedimientos.

2.4. Matriz de consistencia

Tabla 1-2: Matriz de consistencia

PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPOTESIS	VARIABLE
¿Cómo demostrar la fiabilidad de los resultados en la técnica de Numero más probable (NMP) para coliformes fecales en agua consumo según la	Objetivo General Validar el método de ensayo para la determinación de coliformes fecales en agua de consumo por NMP, en base al Standard Methods 9221E para la aplicación en el laboratorio	Los resultados en la técnica de NMP son fiables para la determinación de coliformes fecales en agua de consumo determinados en el	Variables dependientes Fiabilidad de los resultados de la técnica de NMP para coliformes fecales en agua consumo

PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPOTESIS	VARIABLE
técnica del <i>Standard Methods</i> 9221E?	<p>AMBIENLAB Cía. Ltda.</p> <p>Objetivos Específicos</p> <p>-Establecer características de desempeño y criterios de aceptabilidad en conformidad a lo establecido en el <i>Standard Methods</i>.</p> <p>-Evaluar el desempeño del método a partir del cumplimiento de los criterios de aceptación para el parámetro de validación</p> <p>-Elaborar un manual de procedimientos para la determinación de coliformes fecales por NMP.</p>	manual de procedimientos.	<p>Variables independientes</p> <p>técnica del <i>Standard methods</i> 9221B.</p>

Realizado por: Sambachi Johanna, 2021.

2.5. Operacionalización de las variables

Tabla 2-1. Operacionalización de las variables

VARIABLE	CONCEPTO	CATEGORIA	INDICADOR	INSTRUMENTO
<p>Variables dependientes</p> <p>Fiabilidad de los resultados de la técnica de NMP para coliformes fecales en agua consumo.</p>	Certeza de los resultados que se proporciona luego del análisis de microbiológico.	NMP de coliformes fecales en agua de consumo	NMP	Tabla
<p>Variables independientes</p> <p>Técnica del <i>Standard methods</i> 9221E.</p>	la prueba de coliformes fecales es determinar la eficiencia de las operaciones de la planta de tratamiento y la integridad de la distribución del sistema.	Estándar	N. A	Guía

Realizado por: Sambachi Johanna, 2021.

2.6. Selección del método de Referencia

El laboratorio AMBIENLAB CIA LTDA desarrollar el método basándose en los requerimientos establecidos en la norma internacional “*Standard Methods for the Examination of Water and Waster 23th edition*” o “Métodos estandarizados para la examinación de agua u residuos 23ava edición” para la determinación de coliformes fecales (PA, 1996, p.127).

2.6.1. Coliformes fecales

Método SM9221. Técnica de fermentación de tubo múltiple para miembros del grupo coliforme.

La determinación de coliformes fecales se realiza por fermentación de tubo múltiple conocido como NMP en el cual atreves de los tubos positivos y con la ayuda de las tablas de valores de NMP proporcionados por el método realizar los respectivos análisis.

2.7. Selección del método de validación

2.7.1. Validación

Se define como la confirmación a través del examen y aportación de evidencias objetivas que cumplen los requisitos para un uso específico y previsto (Lazos Martínez, y otros, 2004, pp.2-5).

2.7.2. Métodos desarrollados por el laboratorio

AMBIENLAB a través de la validación debe comprobar que el procedimiento del método normalizado del ensayo para la determinación de coliformes fecales es el adecuado para su uso previsto; y, que tiene la destreza para la realización del ensayo, asegurando el desempeño requerido frente a la autoridad competente. Por esta razón el laboratorio, decidió realizar la validación del método y parámetro mencionado para demostrar su correcta aplicación del ensayo.

2.7.3. Elaboración de procedimientos y hojas de cálculo

Se elaboro el procedimiento para coliformes fecales que describen la información necesaria para el desarrollo adecuado del ensayo experimentales. En elANEXO A se adjunta la portada del procedimiento. El laboratorio AMBIENLAB Cía. Ltda proporcionó el formato de los procedimientos para su desarrollo los cuales son de uso exclusivo del laboratorio.

2.8. Criterios de Aceptación y Rechazo

Los laboratorios de ensayo deben considerar como mínimo las siguientes características de desempeño de los métodos (SAE, 2018, p.1):

2.8.1. Límite de Detección

El término “valor mínimo detectable”, se define como la concentración neta mínima detectable de un analito, pero no necesariamente cuantificada a un nivel de confianza especificado (Morillas, 2016, p.387). Para este propósito será normalmente suficiente el enfoque de “3s” de la siguiente manera:

Para los ensayos que contengan cantidades detectables del analito, es recomendable repetir 10 veces calculando la desviación estándar de los resultados como se indica en la ecuación (1):

$$s'_0 = \frac{S_0}{\sqrt{n}} \quad (1)$$

Donde:

S_0 : Desviación estándar de m resultados individuales

S'_0 : Desviación estándar para realizar el cálculo de LOQ y LDO

n : número de réplicas promediadas (mínimo 10)

n_b : número de observaciones blanco-promediadas

Cálculo del LOD

$$LOD = 3 * S'_0 \quad (2)$$

2.8.2. Límite de Cuantificación

Es el nivel del analito que puede ser determinado con desempeño aceptable, es el “valor mínimo cuantificable” que puede ser determinado con nivel de exactitud y precisión aceptables.

El LOQ se calcula como la concentración del analito que corresponde a la desviación estándar a niveles bajos multiplicado por un factor que por defecto es igual 10. Para la determinación del límite de cuantificación se centra en el enfoque del LOD utilizando la ecuación (1) y su resultado se calcula mediante la ecuación (3) (Morillas, 2016, p.387).

$$LOQ = 10 * S'_0 \quad (3)$$

2.8.3. Intervalo de Trabajo

Es el rango o intervalo en el cual el método de ensayo proporciona un resultado aceptable. El extremo inferior del rango de trabajo se encuentra determinado por el límite de cuantificación (LOQ). Para la evaluación del intervalo de trabajo del método se deben tomar en cuenta lo siguiente:

- Muestras con concentraciones conocidas y blancos de muestra disponibles.
- Las muestras que se utilizan deben someterse al procedimiento de medición completo.
- Las concentraciones de diferentes muestras deben cubrir de preferencia el rango que se ha establecido el laboratorio.
- Los instrumentos utilizados deben ser calibrados de acuerdo con el programa de calibración del laboratorio.
- La linealidad y el intervalo de trabajo del método se evalúan a través de una regresión lineal, y la evaluación del rango de trabajo bajo los datos de estudio de precisión y sesgo (Morillas, 2016, p.387).

2.9. Precisión

2.9.1. Repetibilidad

Se denomina la variabilidad en los resultados al realizar una medición con un solo analista y con el mismo equipo en un periodo corto de tiempo, este procedimiento debe realizarse n-veces incluyendo la toma, preparación y la calibración de las muestras (Ochoa, 2018, p.265).

2.9.2. Reproducibilidad

Es una medida de variabilidad de los resultados en controles de calidad y muestra, dadas en un solo laboratorio, pero en condiciones variables: analista, instrumentos, intervalo largo de tiempo, además permite determinar si una serie de análisis pueden repetirse (Bueno, 2018, p.86).

2.9.3. Parámetros y objetivos de validación

A continuación, en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.3-2**, se indican las características de desempeño con los objetivos de validación que se planteó para los parámetros de medición, los mismos que fueron comparados con los resultados experimentales y de esta manera se comprobó el cumplimiento de los objetivos para la validación del método de ensayo (Feldsine, et al., 2002, p.481).

Tabla 3-2. Objetivos de Validación para coliformes fecales

Características de Desempeño	Criterios de aceptación
Intervalo de trabajo	NMP: 1,1-23NMP/100 ml
Precisión	Coefficiente de variación de repetibilidad (CV _r) ≤5 %
	Coefficiente de variación de Reproducibilidad (CVR) ≤5 %
Límite de detección	0,01047
Límite de cuantificación	0,03488

Realizado por: Sambachi Johanna, 2021.

2.10. Diseño Estadístico

Para el tratamiento estadístico de los métodos de ensayo para la determinación de coliformes fecales en el agua de consumo se realizó mediante el análisis simple de varianza (ANOVA); la desviación estándar de reproducibilidad (S_R) y repetibilidad para cada uno de los niveles de ensayo se obtiene la precisión del método. A continuación, en la Tabla 4-2 se observa el número de repeticiones que se realizaron para cada nivel de concentración en los diferentes días de validación (Feldsine, et al., 2002, p.481).

Tabla 4-2. Modelo para ANOVA de un factor de 3*5

Nivel Repeticiones (i)	Días de validación				
	1	2	3	4	5
1	C _{1,1}	C _{2,1}	C _{3,1}	C _{4,1}	C _{5,1}
2	C _{1,2}	C _{2,2}	C _{3,2}	C _{4,2}	C _{5,2}
3	C _{1,3}	C _{2,3}	C _{3,3}	C _{4,3}	C _{5,3}

Realizado por: Sambachi Johanna, 2021.

2.10.1. ANOVA

Un ANOVA es una técnica estadística, prueba la hipótesis de que las medias de dos variables (dependiente e independiente) están relacionadas, a continuación, se observa en la Tabla 5-2 la estructura del ANOVA de un factor que es el que se aplicará para el desarrollo de los métodos de ensayo.

Tabla 5-2. Estructura de ANOVA de un factor

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad (v)	Cuadrado medio	F	F crítico
Entre grupos	$SDC_B = \sum_{i=1}^p (\bar{X}_i - \bar{X})^2$	q-1	$DCM_B = \frac{SDC_B}{q-1}$	$\frac{DCM_B}{DCM_W}$ Con los siguientes grados de libertad: q-1 q (p-1)	Se obtiene de la tabla que se observa en el ¡Error! El resultado no es válido para una tabla.
Dentro de grupos	$SDC_W = \sum_{j=1}^p \sum_{i=1}^q (X_{ij} - \bar{X}_i)^2$	q (p-1)	$DCM_W = \frac{SDC_W}{(q * (p - 1))}$		
Total	$SDC_T = SDC_B + SDC_W$ $SDC_T = \sum (X - \bar{X})^2$	qp - 1	$DCM_T = \frac{SDC_T}{qp - 1}$		

Realizado por: Sambachi Johanna, 2021.

Grados de libertad: se trata de una información subjetiva cuyo valor se obtiene mediante juicio científico basado en el conjunto de informaciones disponibles (VIM, 2012, p.1).

“Los grados de libertad de una prueba estadística son el número de datos que son libres de variar cuando se calcula tal prueba” (Correa, 2006, p.57).

2.11. Puesta a punto

2.11.1. Calibraciones Externas e internas

Los resultados obtenidos de las mediciones realizadas deben establecer trazabilidad metrológica, que de acuerdo con la ISO/IEC 17025 se debe realizar la calibración de todos los equipos empleados para la ejecución de los ensayos para mantener trazabilidad y garantizar la fiabilidad de los resultados (ISO 17025, 2018, p.15).

Para la validación de coliformes fecales se utilizó los siguientes equipos:

- Incubadora Biobase a 44.5°C
- Autoclave
- Balanza

Se realizó la calibración externa mediante un proveedor calificado y acreditado para la calibración de equipos ELICROM.

Los certificados de calibración de los equipos utilizados en la validación se adjuntan en el anexo.

La calibración interna del método se ejecutó mediante las cepas de trabajo ATCC 25922.

2.12. Control de ambientes

Se seleccionaron cuatro puntos de muestreo que son:

- Área de ensayos microbiológicos
- Área de autoclave autoclave.
- Área de ensayos físico-químicos
- Área de balanza

Se lleva a cabo el control de ambientes mediante la técnica de sedimentación:

- 1) Preparación del medio de acuerdo al fabricante.
- 2) En cada punto de muestreo se coloca cajas Petri abiertas con Agar sabouraud para el recuento de hongos y levaduras y cajas Petri abiertas con agar Plate Count para el recuento de bacterias
- 3) Dejar durante 30 minutos.
- 4) Las cajas con agar incubar en posición invertida durante 24 horas.
- 5) Finalizado el periodo de incubación, se realizó el recuento de microorganismos.
- 6) Registrar los resultados obtenidos en RE-COA-01.
- 7) Este procedimiento fue realizado cada dos semanas para el control de ambientes colocando dos placas por área de muestreo.

2.13. Verificación de calidad medios de cultivo.

2.13.1. Control de esterilidad

Se preparan 10 cajas de Petri con agar Plate Count y 10 con agar dextrosa de Sabouraud. Se prepara 10 tubos de ensayo con caldo Lauril Sulfato y 10 con medio-EC. Del total de cajas o tubos se retiraron un número equivalente al 20% de la totalidad de cajas y tubos servidos.

Se llevan las cajas o tubos elegidos al a azar a incubación a 35 °C durante 48 horas.

Se verificó que no presente crecimiento de ningún tipo en las cajas y turbidez o gas en la campana de Durham en los tubos.

2.13.2. Control de pH

Se tomó una muestra del medio preparado y se introdujo el multiparámetro. El valor obtenido debe corresponder al indicado en el certificado de análisis del medio, en donde se da un intervalo de aceptación de +/- 2.

Ajuste el pH con 1 M NaOH o 1M HCL en caso de no ser el indicado por el productor.

2.14. Revitalización de cepas

Las cepas ATCC (“*American Type Culture Collection*”) fueron revitalizadas siguiendo el procedimiento adjunto de las cepas de referencia *E. coli*, adquiridas por el proveedor MEDIBAC de la siguiente manera:

1. La unidad KWIK-STIK se saca de su lugar de almacenamiento y se deja que alcance la temperatura ambiente.
2. El líquido hidratante fue liberado aplastando la ampolla, de esta manera fluye hacia el hisopo que se encuentra en la parte inferior donde está una pastilla de gelatina.
3. Triturar la pastilla aplastando la parte inferior para que se mezcle con el líquido, obteniendo una suspensión homogénea.
4. Se satura inmediatamente el hisopo con el material hidratado y se transfiere al medio Agar Sangre de Cordero colocando el nombre de la cepa y la fecha de activación para las cepas, realizando agotamiento por estrías de tal manera que cubra todo el agar.
5. El medio de cultivo fue incubado a la T de 35°C.
6. Registrar la fecha de activación en el registro RE-ACK-01 cepa *E. coli*.

2.15. Preparación de inóculo

PREPARACIÓN DE ESTÁNDARES PARA COLIFORMES FECALES

- 1) Materiales
 - o Tubos de ensayo de 20ml
 - o Agua destilada estéril
- 2) Procedimiento para coliformes fecales:
 - a) Se partió de la suspensión bacteriana (Colonias *E. coli* + agua destilada estéril), de absorbancia 0,070 lo que indica una concentración de $1,5 \cdot 10^8$ bacterias/ml
 - b) La concentración de 10^8 se diluyó 1:100 (0,1ml de suspensión bacteriana + 9,9ml de agua destilada estéril) obteniendo una concentración de $1,5 \cdot 10^6$ ufc/ml

- c) La concentración de 10^6 se diluyó 1:100 (0,1 ml de suspensión bacteriana + 9,9ml de agua destilada estéril) obteniendo una concentración de $1,5 \cdot 10^4$ ufc/ml
- d) Se diluyó la concentración 10^4 en proporción 1:10 (1ml de suspensión bacteriana+9ml de agua destilada estéril) para obtener una concentración de 10^3 ufc/ml que se utilizó como solución madre.
- e) A partir de la solución madre se prepararon 3 soluciones estándar para NMP rango: 50,100 y 1000 y tres soluciones estándar para el método de filtración en el rango: 10,50 y 100 usando la siguiente fórmula
- f) $C_1V_1 = C_2V_2$

$$V_2 = \frac{C_1 * V_1}{C_2}$$

Donde:

C1: Concentración a la que se desea llegar

V1: Volumen requerido

C2: Concentración de solución madre

V2: Volumen a tomar de la solución madre

$$V_2 = \frac{100 \text{ UFC/ml} * 100 \text{ ml}}{1,5 * 10^3}$$

$$V_2 = 6,67 \text{ ml}$$

$V_2 = 6,67$ ml es el volumen que se debe tomar de la solución madre y aforar a 100ml.

g) Nota: Usar la misma fórmula para el cálculo de inóculo para rango bajo medio y alto.

h) Una vez realizado el estándar seguir el procedimiento PRM-01, PRM-02 para NMP y el procedimiento PRM-03 y PRM-04 para Filtración de Membrana según aplique.

NOTA: Los resultados obtenidos registrar en RE-RCC-01 “registro de resultados del control de calidad de las cepas de referencia” proporcionado por el laboratorio Ambienlab.

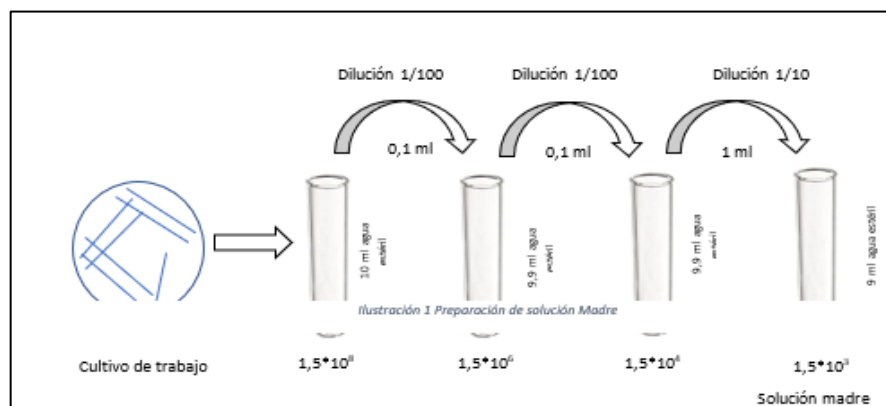


Figura 2-2. Estándares de dilución

Realizado por: Sambachi Johanna, 2021.

2.16. Procedimientos coliformes fecales por el método de número más probable

Materiales

Tabla 6-2. Equipos, Instrumentos y materiales

Equipo/Instrumento/Material
Tubos de ensayo 20 ml
Tubos de ensayo 10 ml
Gradilla
Campanas Durham
Caldo Lauril Sulfato
Caldo EC
Pipeta digital 10 ml
Pipeta digital 1 ml
Incubadora BIOBASE 45°C
Autoclave
Balanza
Asa microbiológica
Mechero
Agar sangre de cordero
Cepa ATCC 92

Realizado por: Sambachi Johanna, 2021.

Fase Presuntiva

1. Disponer los tubos de ensayo en una fila de diez en una gradilla plástica, cada uno con su respectiva campana de Durham invertida.
2. Añadir 10ml de Caldo Lauril Sulfato Simple. Como se indica en 9.2.1.
3. No cerrar completamente los tubos y esterilizar a 121°C durante 15 minutos.
4. Esperar que se encuentren a temperatura ambiente.
5. Antes de realizar la siembra se recomienda agitar las diluciones y muestras para homogeneizarlos.
6. En los 10 tubos se inoculan con 1 ml de muestra
7. Incubar los tubos inoculados a 44,5 °C.
8. Observar si existe presencia de gas o turbidez a las 24h, si no es así observar resultados a las 48h.
9. Registrar Los tubos con resultado positivo (presentan turbidez o presencia de gas en la campana de Durham).

Fase Confirmativa

1. Añadir 10ml del medio EC en los tubos de ensayo con una campana de Durham invertida.
2. No cerrar los tubos completamente y esterilizar a 121°C durante 15 minutos.
3. Agitar los tubos primarios de la fase presuntiva que presenten un posible caso positivo.
4. Con un asa estéril, se pasa un asa completa de cultivo al tubo de fermentación que contiene el medio EC.
5. Este medio incubar a 44,5°C durante 48 horas.
6. Los resultados serán presentados en NMP y serán registrados en el formato REA-AG-07.

CAPÍTULO III

3. MARCO DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los datos que se obtuvieron a lo largo de la validación serán registrados en el formato proporcionado por AMBIENLAB CIA LTDA. Para ser analizados con la ayuda de una hoja de cálculo Excel, con el fin de realizar un análisis estadístico, donde se determinó, el análisis de repetibilidad, análisis de reproducibilidad, Análisis de Varianza y límite de detección y cuantificación, los cuales se tabularon e interpretaron para beneficio del laboratorio AMBIENLAB. CIA LTDA.

Para realizar los cálculos de repetibilidad y reproductividad se realizó el análisis de la muestra durante 5 días, 3 réplicas diarias.

Para la validación de coliformes fecales por número más probable se inoculo el agua de consumo partiendo del tubo 10^1 de la 0,5 Mc Farland que da una concentración de 15 UFC.

3.1. Datos experimentales

En la tabla se representarán los valores numéricos en NMP/100ml obtenidos en el conteo de tubos positivos obtenidos de la fase confirmativa.

Tabla 1-3. Valores numéricos de NMP

AGUA DE CONSUMO NMP				
Grupo 1 (i)	Grupo 2 (i)	Grupo 3 (i)	Grupo 4 (i)	Grupo 5 (i)
16	16	16	23	16
16	12	23	16	23
23	16	16	23	16

Realizado por: Sambachi Johanna, 2021.

Para el análisis estadístico los datos obtenidos en la validación estos serán transformados a logaritmo en base 10, lo cual facilitara el estudio estadístico de los resultados.

Tabla 2-3. Valores numéricos de NMP transformados a logaritmo

AGUA DE CONSUMO NMP				
Grupo 1 (i)	Grupo 2 (i)	Grupo 3 (i)	Grupo 4 (i)	Grupo 5 (i)
1,2041	1,2041	1,2041	1,3617	1,2041
1,2041	1,0792	1,3617	1,2041	1,3617
1,3617	1,2041	1,2041	1,3617	1,2041

Realizado por: Sambachi Johanna, 2021.

3.2. Cálculos para la determinación precisión

Para obtener estimaciones de repetibilidad y reproducibilidad, se analizaron los datos obtenidos mediante análisis de varianza (ANOVA) de un factor. Se planteó como hipótesis nula que la variación entre los resultados obtenidos en distintas condiciones de medida no es superior a la variación de los resultados obtenidos en las mismas condiciones. Una vez evaluada la hipótesis nula en cada caso, se procedió a calcular la desviación estándar de repetibilidad (Sr) y la desviación estándar de reproducibilidad (SR). Para obtener las medidas de precisión en porcentaje, se calcularon el coeficiente de variación de repetibilidad (CVr) y el coeficiente de variación de reproducibilidad (CVR) en cada matriz y en cada rango de concentración.

Se tomó como modelo los resultados obtenidos para la determinación de coliformes fecales en una matriz de 3 x 5 en agua natural a un nivel de 1 mg/L como se presenta en la Tabla 3-3.

Tabla 3-3. ANOVA

REPETICIONES	AGUA DE CONSUMO NMP				
	Grupo 1 (i)	Grupo 2 (i)	Grupo 3 (i)	Grupo 4 (i)	Grupo 5 (i)
1	1,2041	1,2041	1,2041	1,3617	1,2041
2	1,2041	1,0792	1,3617	1,2041	1,3617
3	1,3617	1,2041	1,2041	1,3617	1,2041
Promedio de grupos (\bar{X}_i)	1,26	1,16	1,26	1,31	1,26
Promedio de las medias (\bar{X})	1,25				
p	3				
q	5				
Si	0,09099	0,07211	0,09099	0,09099	0,09099
Varianza grupos S_i^2	0,00828	0,00520	0,00828	0,00828	0,00828
Máximo (S_i^2)	0,008279253				
Cochran calculado	0,216072493				
Cochran tabla	0,683				

Realizado por: Sambachi Johanna, 2021.

- p= número de repeticiones
- q= número de grupos

Cálculo del promedio del grupo de datos (\bar{X}_i)

$$\bar{X}_i = \frac{\sum_{p=1}^3 X_i}{p}$$

Donde:

- X_i = datos por grupo

$$\bar{X}_i = \frac{(1,2041 + 1,2041 + 1,3617)}{3} = 1,26$$

Cálculo del promedio de las medias de grupos (\bar{X})

$$\bar{X} = \frac{\sum_{q=1}^5 \bar{X}_i}{q}$$

Donde:

- \bar{X}_i = media de grupo

$$\bar{X} = \frac{(1,26 + 1,16 + 1,26 + 1,31 + 1,26)}{5} = 1,25$$

Cálculo de la varianza de grupos (S_i)

$$S_i^2 = \frac{\sum_{j=1}^3 (X_{ij} - \bar{X}_i)^2}{p - 1}$$

Donde:

- X_{ij} = Valor de análisis

$$S_i^2 = \frac{(1,2041 - 1,26)^2 + (1,2041 - 1,26)^2 + (1,3617 - 1,26)^2}{3 - 1} = 0,00828$$

Cálculo de Cochran

$$C = \frac{\max(S_i)^2}{\sum_{i=1}^q S_i^2}$$

$$C = \frac{0,008279253}{(0,00828 + 0,00520 + 0,00828 + 0,00828 + 0,00828)} = 0,216072493$$

Selección de Cochran crítico

El valor de Cochran crítico tomado de la tabla presentada en el Anexo, donde se selecciona el valor, tomando en cuenta el número de repeticiones (columna) y el número de grupos (filas) para un valor de $\alpha = 0,05$. Dando como resultado 0,683 para una matriz de 3 x 5.

La prueba se realiza para determinar la homogeneidad de los datos teniendo un nivel de confianza del 95%.

Para lo que se plantea una hipótesis nula, el enunciado de la hipótesis nos dice que si el valor de Cochran calculado (C) es menor al valor de Cochran crítico el grupo es relativamente uniforme. De acuerdo a la regla de decisión se acepta la hipótesis nula, que expresa que las varianzas de los grupos son relativamente uniformes.

Si $C \leq C$ crítico, se acepta la hipótesis nula.

Si $0,216 \leq 0,683$, grupo uniforme.

Grados de libertad entre grupos (v_e)

$$v_e = q - 1$$

$$v_e = 5 - 1$$

$$v_e = 4$$

Grados de libertad dentro de los grupos (v_i)

$$v_i = (q \times p) - q$$

$$v_i = 15 - 5$$

$$v_i = 10$$

Cálculo de la suma de diferencias cuadráticas entre grupos (SDC_B)

$$SDC_B = p * \sum_{i=1}^5 (\bar{X}_i - \bar{X})^2$$

$$SDC_B = 3 * [(1,26 - 1,25)^2 + (1,16 - 1,25)^2 + (1,26 - 1,25)^2 + (1,31 - 1,26)^2 + (1,26 - 1,25)^2]$$

$$SDC_B = 0,03384$$

Cálculo de la determinación del valor medio de las sumas de las diferencias al cuadrado entre grupos (DCMB).

$$DCM_B = \frac{SDC_B}{v_e}$$

$$DCM_B = \frac{0,03384}{4}$$

$$DCM_B = 0,00846$$

Cálculo de la suma de diferencias cuadráticas dentro de los grupos

$$SDC_w = \sum_{i=1}^5 \sum_{j=1}^3 (X_{ij} - \bar{X}_i)^2$$

$$SDC_w = 0,07663$$

Cálculo del promedio de la suma de diferencias cuadráticas dentro del grupo

$$DCM_w = \frac{SDC_w}{v_i}$$

$$DCM_w = \frac{0,07663}{10}$$

$$DCM_w = 0,00766$$

3.2.1. *F calculado*

Se calcula utilizando la siguiente formula.

$$F = \frac{DCM_B}{DCM_w}$$
$$F = \frac{0,07663}{0,00766}$$
$$F = 1,104$$

El valor del estadístico F-Fisher se toma de la tabla presentada en el Anexo, donde se selecciona el valor, tomando en cuenta un valor de $\alpha=0,05$ teniendo un nivel de confianza del 95%. Dando como resultado 1,104 para una matriz de 3 x 5.

La prueba se realiza para determinar si existe o no una diferencia significativa de los datos teniendo un nivel de confianza del 95%.

Para lo que se plantea una hipótesis nula, el enunciado de la hipótesis nos menciona que no existe diferencias significativas dentro de los datos obtenidos si el valor de Fisher calculado (F) es menor al valor de Fisher crítico (F crítico).

De acuerdo a la regla de decisión se acepta la hipótesis nula.

Un grupo no tienen diferencias significativas si $F \leq F$ crítico, se acepta la hipótesis nula.

Si $1,104 \leq 3,478$ NO EXISTEN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS

3.3. Precisión

3.3.1. *Repetibilidad*

Cálculo de la desviación estándar por Repetibilidad

$$S_r = \sqrt{DCM_w}$$

$$S_r = \sqrt{0,00766}$$

$$S_r = 0,08754$$

Cálculo del coeficiente de variación de repetibilidad

$$\%CV_r = \frac{S_r}{\bar{X}} \times 100$$

$$\%CV_r = \frac{0,08754}{0,0439} \times 100$$

$$\%CV_r = 7,01$$

Al obtener un coeficiente de variación de repetibilidad de un 7,01% concluimos que nuestro método si es repetible.

3.3.2. Reproducibilidad

Cálculo de la desviación estándar por reproducibilidad

$$S_R = \sqrt{(S_r)^2 + (S_L)^2}$$

$$S_R = \sqrt{(0,08754)^2 + (0,0002656)^2}$$

$$S_R = 0,08905$$

Cálculo del coeficiente variación por reproducibilidad

$$\%CV_R = \frac{S_R}{\bar{X}} \times 100$$

$$\%CV_R = \frac{0,08905}{0,0439} \times 100$$

$$\%CV_R = 7,13$$

Al obtener un coeficiente de variación de reproductividad de un 7,13% concluimos que nuestro método si es reproducible.

3.4. Límite de cuantificación y límite de detección

Para la determinación del límite de cuantificación y límite de detección se ha procedido a tomar diez datos del agua de consumo sin inocular debido que en este tipo de agua no se encuentra la presencia de coliformes fecales y se lo puede denominar como blanco lo que ayuda para el cálculo de estos dos parámetros. Los datos obtenidos del blanco se presentan en la tabla 4.3 a continuación presentada:

Tabla 4-3. Datos NMP del blanco

REPETICIONES	RESULTADOS
1	1,1
2	1,1
3	2
4	1,1
5	1,1
6	1,1
7	1,1
8	1,1
9	1,1
10	1,1

Realizado por: Sambachi Johanna, 2021.

3.4.1. Desviación estándar

Se realizó el cálculo de la desviación estándar aplicando la ecuación

$n = 10$

$$S_0 = \sqrt{\frac{\sum(X - \bar{X})^2}{n}}$$
$$S_0 = 0,2846$$

3.4.2. Límite de detección

$$LOD = 3 * S'_0$$

$$LOD = 3 * 0,2846$$

$$LOD = 0,02040$$

3.4.3. Límite de cuantificación

$$LOQ = 10 * S'_0$$

$$LOQ = 10 * 0,2846$$

$$LOQ = 0,068$$

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Para la validación de métodos de coliformes fecales parámetros de validación seleccionados fueron: Intervalo de trabajo, precisión, veracidad; mientras que, para los métodos, límite de detección y límite de cuantificación. Las características de desempeño se establecieron de acuerdo con las necesidades del laboratorio AMBIENLAB. Cía. Ltda. Las normas oficiales, guía para realizar la validación en aguas fue: *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, así como la norma INEN 1108.

Para la evaluación de repetibilidad del método de ensayo se realizó por el mismo analista, en el mismo lugar y en un intervalo pequeño de tiempo. Por otro lado, para la evaluación de reproducibilidad se efectuaron durante días diferentes, en el mismo lugar y con la participación del mismo operador (condiciones de reproducibilidad).

Los resultados obtenidos en el ANOVA se evidencian que los valores de CV_R es mayores que el valore de CV_r esto se debe que las variaciones de los resultados son mayores entre días que las mediciones realizadas el mismo día en un intervalo de tiempo menor, sin embargo, la repetibilidad y reproducibilidad cumplen con el criterio de aceptación $\leq 5\%$ demostrando que es un método preciso.

CONCLUSIONES

- Se validó el método de ensayo para la determinación de coliformes fecales mediante la validación del método SM 9221 B, a través de la norma oficial Standard Methods. Se llevó a cabo mediante la calibración externa de los equipos, uso de materiales de referencia certificados y evaluación de precisión. El método demostró que es aplicable de forma competente en el laboratorio AMBIENLAB. Cía. Ltda.
- Las características de desempeño se establecieron de acuerdo con la norma NTE INEN-ISO 17025:2017 y a la Guía Eurachem, que indica las características de desempeño mínimas que se debe tomar en cuenta para una validación como: intervalo de trabajo, límite de detección, límite de cuantificación y precisión. También se tomó en cuenta las necesidades analíticas del laboratorio AMBIENLAB Cía Ltda. Los objetivos de validación se fijaron a través de la revisión bibliográfica consultada de otros laboratorios acreditados, la puesta a punto del método, y el criterio técnico de un analista experto con el fin de demostrar validez de los resultados del ensayo para la aplicación en el laboratorio.
- El desempeño del método para la determinación de coliformes fecales se evaluó mediante la confirmación de los criterios de aceptación, luego de realizar la evaluación de todas las magnitudes asociadas a las mediciones se demostró 100% del cumplimiento de todos los objetivos de validación establecidos.
- Se elaboró un manual de procedimientos para la determinación coliformes fecales estableciendo lineamientos específicos como: realización del ensayo, aseguramiento de la validez de los resultados, también se realizaron procedimientos de uso, manipulación, mantenimiento y transporte de los equipos, así como, registros primarios, hojas de cálculo, hojas de vida de equipos control de calidad de ambientes, control de esterilidad, control de medios de cultivo, entre otros. Toda la documentación fue entregada al laboratorio y es de uso exclusivo del mismo.
- Para asegurar la fiabilidad de los resultados del método de ensayo se calibraron todos los equipos con un proveedor calificado ELICROM para demostrar que el laboratorio es competente y tiene la capacidad de generar resultados técnicamente válidos y confiables.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar verificaciones de los métodos de ensayo con material de referencia certificado con una frecuencia mensual al menos en un nivel de concentración para asegurar la calidad de los resultados obtenidos.
- Se recomienda la participación en ensayos de aptitud de manera anual para garantizar el desempeño y confiabilidad del método.

BIBLIOGRAFÍA

AGUILAR, BEATRIZ CASTILLO. Protocolo de validación de métodos analíticos para la cuantificación de fármacos. 2002. pág. 1561.

AMBIENLAB. Ambienlab. [En línea] 2018. <http://www.ambienlab.com.ec/>.

AQUAE. AQUAE fundacion. Que es el agua. [En línea] 2018. [Citado el: 10 de enero de 2021.] <https://www.fundacionaquae.org/que-es-el-agua/#:~:text=Tipos%20de%20agua&text=Dulce%3A%20se%20encuentra%20en%20>

ARIAS, L. Validación de un método analítico para la cuantificación de vitamina A en alimentos, por cromatografía líquida de alta resolución y su determinación en guayaba fresca. [En línea] 2014. <http://biblio3.url.edu.gt/Tesario/2014/02/02/Arias-Luisa.pdf>.

ARMENTEROS, A. Error, Incertidumbre, Precisión y Exactitud. [En línea] 2007. http://coello.ujaen.es/congresos/cicum/ponencias/Cicum2010.2.02_Ruiz_y_otros_Error_incertidumbre_precision.pdf.

ARRONDO, V. Análisis de Varianza F de Fisher. [En línea] 2014. <http://asignatura.us.es/dadpsico/apuntes/EpAnalisisVarianza.pdf>.

BACHOON DS, et al. BACHOON DS, Markand S, Otero E, Perry G, Ramsubaugh A. Assessment of non- point sources of fecal pollution in coastal waters of Puerto Rico and Trinidad. Puerto Rico and Trinidad : Marine Pollution Bulletin., 2010. pág. 452.

BADGLEY, et al. Quantifying environmental reservoirs of fecal indicator bacteria associated with sediment and submerged aquatic vegetation. s.l. : Environmental Microbiology, 2011. pág. 76.

BAIRD, et al. Standard Method for the Examination of Water and Wastewater. 23. 2017. p. 934.

BUENO, E. Desarrollo y validación de métodos analíticos para la cuantificación de antifúngicos triazólicos en muestras preclínicas y clínicas. 2018. pág. 86.

CARRILLO E. Validacion del metodo de deteccion de coliformes totales y fecales en agua potable. Bogota: s.n., 2008. pág. 784.

CORREA. Estudio de potencia de pruebas de homogeneidad. 2006. pág. 57.

DELGADO, et al. Indicadores microbiológicos de calidad del agua. La Habana. : Hig San Ambient, 2008. pág. 95.

ECKNER, KF. Comparison of membrane filtration and multiple-tube fermentation by the colilert and enterolert methods for detection of waterborne coliform bacteria, Escherichia coli, and enterococci used in drinking and bathing water quality monitoring. 1998. pág. 87.

EPA. Soil and waste pH. [En línea] 2004. <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/9045d.pdf>.

FELDSINE, et al. AOAC International methods committee guidelines for validation. maryland : AOAC International, 2002. p. 481.

FERNANDEZ, J. El agua un recurso esencial. buenos aires : s.n., 2012. pág. 189.

GARONIS, H. y CAMACHO, E. Proceso de realización de los ensayos de aptitud por comparación interlaboratorios. [En línea] 2010. <https://www.cenam.mx/sm2010/info/pviernes/sm2010-vp06a.pdf>.

GLYNN. Ingeniería Ambiental. México : Mexico Prentice Hall, 1999. pág. 37.

GUM. Estimación de incertidumbres de la medición. [En línea] 2012. https://www.uv.es/meliajl/Docencia/WebComplementarios/GuiaGUM_e_medida.pdf.

HARTL, M. Agua para la salud: un derecho humano. Ginebra : s.n., 2002. pág. 25.

HINOSTROZA, M. Aplicación del cálculo de incertidumbre combinada. [En línea] 2006. <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2006/fcg643a/sources/fcg643a.pdf>.

INEN 1108. NTE INEN 1108 Agua potable. Parte 1: requisitos. 2011. pág. 47.

ISO 17025. Requisitos Generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración. 2018. pág. 22.

ISO 21748. Orientación para el uso de estimaciones de repetibilidad, reproducibilidad y veracidad en la evaluación de la incertidumbre de la medición. [En línea] Abril de 2017.

JCGM. 2012. Vocabulario Internacional de Metrología. [En línea] 2012. <https://www.cem.es/sites/default/files/vim-cem-2012web.pdf>.

JUMAPAM. Distribución del agua en el Planeta. Jumapam.gob.mx. [En línea] 2019. [Citado el: 10 de enero de 2021.] <http://jumapam.gob.mx/cultura-del-agua/distribucion-de-agua-en-el-planeta/#:~:text=El%2097.5%25%20del%20agua%20en,encuentra%20en%20un%20estado%20s%C3%B3lido..>

PÁEZ, J. La interpolación lineal en la distribución T. 3, 3 de Diciembre de 2009, Vol. 21, pág. 268.

LAZO. Guía para estimar la incertidumbre de la medición. [En línea] 2000. [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/GUIAPARAESTIMARLAINCERTIDUMBRE\(CE NAM\)_26566.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/GUIAPARAESTIMARLAINCERTIDUMBRE(CE NAM)_26566.pdf).

LAZOS. La validación de métodos: un enfoque práctico. [En línea] 25 de Octubre de 2004. <https://www.cenam.mx/simposio2004/memorias/TA-090.pdf>.

LOPEZ. El agua como recurso. Costa Rica : s.n., 2006. pág. 15.

MARCOSENDE. EL DIAGRAMA CAUSA-EFECTO . [En línea] 2015. <http://148.202.167.116:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/1572/Gesti%C3%B3n%20de%20la%20calidad%20la%20seguridad%20y%20el%20medio%20ambiente%20%284%C2%BA%20Organizaci%C3%B3n%20industrial%29.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

MARIN B, et al. Diagnóstico y evaluación de la calidad ambiental marina en el Caribe y Pacífico colombiano red de vigilancia para la conservación y protección de las aguas marinas y costeras. colombia : Diagnostico Nacional y Regional, 2004. pág. 327.

MINISTERIO DEL AMBIENTE. Registro Oficial No. 097-A. [En línea] miércoles de Noviembre de 2015. <http://extwprlegs1.fao.org/docs/pdf/ecu155128.pdf>.

MORILLAS, P. Una Guía de Laboratorio para Validación de Métodos y Temas Relacionados. 2016. pág. 387.

MUNN. Ecología y aplicaciones. Nueva York : BIOS Scientific, 2004. pág. 123.

MUNN, C. Marine microbiology. New York : Bios publisher, 2004. pág. 97.

NARVÁEZ, ET AL. Coliformes termotolerantes en aguas de las poblaciones costeras y palafíticas de La Ciénaga Grande de Santa Marta, Colombia. Santa Marta : Actabiol colomb, 2008, pág. 784.

NTE INEN-ISO/IEC 17043. Evaluación de la conformidad-Requisitos generales para los ensayos de aptitud. 2011.

OCHOA, J. Validación de métodos de ensayo para DQO, tensoactivos; y aceites y grasas en aguas, en el Laboratorio Ambiental y Consultoría Environovalab Cía. Ltda. 2018. pág. 265.

OLAYA, J. [En línea] 16 de 08 de 2016. <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/59274/jaimeorlandobarinasolaya.2016.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

ONUDI. Servicio de Acreditación Ecuatoriano. [En línea] 2017. <https://www.acreditacion.gob.ec/que-es-la-validacion-de-metodos-de-laboratorios/>.

ÖRNEMARK, B. Guía Eurachem. primera en español. 2016. pág. 645.

PA. Standar method 9221B. 1996. pág. 127.

PROAÑO. Identificar la presencia de bacterias coliformes fecales totales en el agua de consumo humano en el canton patate. Ambato : s.n., 2017. pág. 48.

RAE. agua. Real Audiencia Española. [En línea] 2014.

RODRÍGUEZ, J. Validación de Técnicas instrumentales turbiedad y pH para el tratamiento de agua potable. [En línea] 2014. <http://repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/handle/11059/4809/628161R586.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

ROMÁN, K. Validación de Métodos de ensayo para determinación de pH, Conductividad, Sólidos. [En línea] 2018. <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/15362/1/T-UCE-0017-0095-2018.pdf>.

SAE. Servicio de Acreditación Ecuatoriana. [En línea] 2018.

SALAZAR, M. Política para la estimación de la incertidumbre de la medicion. [En línea] 29 de 01 de 2018. <https://www.acreditacion.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2018/02/PL02-R02-Politica-incertidumbre.pdf>.

SEVILLA, J. Validacion de famotidina de 40mg tableta por espectrofotometria ultravioleta visible (UV-vis). [En línea] 2013. <http://riul.unanleon.edu.ni:8080/jspui/bitstream/123456789/5933/1/221142.pdf>.


SWISTOCK, B. Bacterias Coliformes. Pennsylvania : PennStateextencion, 2015. pág. 54.

VIM. Vocabulario Internacional de Metrología. [En línea] 2012. <https://www.cem.es/sites/default/files/vim-cem-2012web.pdf>.


WILLIAMS, et al. Cuantificación de la Incertidumbre en medidas analíticas. [En línea] 2012. http://www.citac.cc/QUAM2012_P1_ES.pdf.

ZAMUDIO, et al. Tablas de Probabilidades. [En línea] 2016. <http://estadistica.itam.mx/sites/default/files/u450/tablasprobabilidades.pdf>.

ANEXO B. HOJA DE CÁLCULO PARA LA VALIDACIÓN EN EXCEL

	<h2>HOJA DE CÁLCULO MATRICES</h2>					EDICIÓN:	3
						FECHA DE APROBACIÓN:	21/2/2020
						PÁGINA:	3 DE 3
Cepa de referencia:	<i>E. coli</i> <i>Klebsiella spp.</i>						
Medio de Cultivo fase presuntiva:	Caldo Lauril Sulfato						
Medio de Cultivo fase confirmativa:	Caldo Ec						
MÉTODO: DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES							
AA	INCUBADORE BIÓBASE					CÓDIGO	AMB-EQ-089
	AGUA DE CONSUMO NMP					UBICACIÓN	LABORATORIO
REPETICIONES	Día1	Día2	Día3	Día4	Día5		
1	1,2041	1,2041	1,2041	1,3617	1,2041		
2	1,2041	1,0792	1,3617	1,2041	1,3617		
3	1,3617	1,2041	1,2041	1,3617	1,2041		
Li	1,26	1,16	1,26	1,31	1,26		
Lg	1,25						
p	3						
q	5						
Si	0,09099	0,07211	0,09099	0,09099	0,09099		
Sic cuadrado	0,00828	0,00520	0,00828	0,00828	0,00828	PROPIEDAD DE AMBIENLAB CIA LTDA	
Simax cuadrado	0,008279253						
Gmax calculado	0,216072493						
Gmax	0,592						

ANEXO C. CERTIFICADOS DE CALIBRACIÓN DEL MULTIPARÁMETRO HACH

			
<p>ISO 9001 Certified TEST CERTIFICATE For the Conductivity Probe</p>			
Model	Serial Number	Date	Quality Check
CDC40101	191622587974	6/11/2019	PASS
Tested Characteristic	Min	Max	Value
Probe Recognition			PASS
Physical Inspection			PASS
Reference Temperature (°C)	15	30	21.77 PASS
Diff. Temperature probe vs ref. (°C)	-0.3	0.3	0.09 PASS
Calibration Temperature (°C)	15	35	21.86 PASS
Cell Constant (cm-1)	0.37	0.50	0.47 PASS
	Nominal	Type	
Standard I	1000 uS @25°C	NaCl	
<p><small>Test equipment used for the verification of Hach manufactured instruments is calibrated using standards traceable to National Institute of Standards and Technology (NIST) standards. Where such standards do not exist, the basis for calibration is documented.</small></p>			
<p><small>FOR TECHNICAL ASSISTANCE, PRICE INFORMATION AND ORDERING: In the U.S.A. - Call toll-free 800-227-4324 Outside the U.S.A. - Contact the HACH office or distributor serving you. On the Worldwide Web - www.hach.com; E-mail: techhelp@hach.com</small></p>		<p><small>HACH COMPANY WORLD HEADQUARTERS Telephone: (970) 669-3850 FAX: (970) 669-2532</small></p>	


ANEXO F. MULTIPARAMETRO HACH SONDA PARA pH



ANEXO G. ESPECTROFOTÓMETRO HACH DR 6000



ANEXO J. CERTIFICADO DE ANALISIS MEDIO EC


Certificate of Analysis

Becton Dickinson and Company
BD Diagnostic Systems
PO Box 999
Sparks MD 21152-0999 US Page: 1 of 2

Product Name : Bottle EC Medium 500G
Catalog Number : 211430 **Manufacture Date**: 2019/03/19
Batch Number : 9161608
Expiration Date : 2024/03/31

01. Dehydrated Medium Appearance: Light beige, free-flowing, homogeneous.
02. Solubility: 3.7% solution, soluble in distilled or deionized water.
03. Solution Appearance: Light amber, clear.
04. Cultural Response: Medium was prepared per label instructions. Tubes with fermentation vials were inoculated with the test organisms and incubated at 44.5 ± 0.2°C for 24 ± 2 hours.

TEST ORGANISMS	ATCC#	RECOVERY	TEST PRODUCTION
Enterococcus faecalis	19413	Inhibited	-
Escherichia coli	25922	good	+
Escherichia coli	8739	good	+


Characteristic	Unit	Value	Lower Limit	Upper Limit
pH at 25°C :		7.0	6.7	7.1
Batch Lot Number :		9077940		

Animal source	Country of Origin	Tissue Category		
		BIC	SIC	ABC
Bovine	Australia	IV	IV	IC
Bovine	Australia	IV	IV	MLK
Bovine	Brazil	IV	IV	IC
Bovine	India	IV	IV	IC
Bovine	Mexico	IV	IV	IC
Bovine	New Zealand	IV	IV	IC
Bovine	New Zealand	IV	IV	MLK
Bovine	USA	IV	IV	IC
Bovine	USA	IV	IV	MLK
Ovine	New Zealand	IV	IV	IC
Porcine	USA	III	III	IB
Porcine	USA	III	III	IB

The Batch Number on this certificate is synonymous with the Lot Number shown on the product label.
BD Diagnostics - Diagnostic Systems products are manufactured in ISO 13485:2016 Registered facilities. In addition, BD Diagnostics - Diagnostic Systems facilities are registered with the United States Food and Drug Administration (FDA), and are regulated by the FDA's Quality System Regulations (QSRs). This product met BDES stringent quality standards at time of batch/lot release. Any test results reported on this certificate were obtained at time of release. This

Creation Date: 2019/07/01 17:06:14

ANEXO K. CERTIFICADO DE ANALISIS CALDO LAURIL SULFATO


Certificate of Analysis

Becton Dickinson and Company
BD Diagnostic Systems
PO Box 999
Sparks MD 21152-0999 US Page: 1 of 2

Product Name : Bottle Lauryl Sulfate Broth 500G
Catalog Number : 211338 **Manufacture Date**: 2019/03/14
Batch Number : 9141969
Expiration Date : 2023/03/31

01. Dehydrated Medium Powder Appearance: Fine, homogeneous and free of extraneous material.
02. Solubility (35.6g/L): Soluble in distilled or deionized water.
03. Prepared Medium Appearance: Pale to light, tan to yellow, clear to slightly hazy.
04. Meets ISO11133 performance specifications: Tubes were inoculated as indicated below and incubated at 30 ± 1°C for 16-20 hours.

ORGANISMS	ATCC#	CFUs	RESULTS
Escherichia coli	8739	</= 100	good growth with gas
Escherichia coli	25922	</= 100	good growth with gas
Citrobacter freundii	43864	</= 100	good growth with gas
Enterococcus faecalis	19413	approx. 1000	no growth
Enterococcus faecalis	29212	approx. 1000	no growth

05. Biological Performance: Media was prepared per label directions. Tubes were inoculated with the test organisms, incubated at 33-37°C for 48 hours and gave cultural responses as indicated:

CULTURE	ATCC#	RESULT
Enterobacter aerogenes	13038	Light to heavy growth, gas production
Enterococcus faecalis	29212	Partial to complete inhibition, no gas
Escherichia coli	25922	Light to heavy growth, gas production
Proteus mirabilis	12453	Light to heavy growth, no gas

Characteristic	Unit	Value	Lower Limit	Upper Limit
pH at 25°C :		6.9	6.6	7.0
Batch Lot Number :		9070929		

Animal source	Country of Origin	Tissue Category		
		BIC	SIC	ABC
Bovine	New Zealand	IV	IV	MLK
Bovine	USA	IV	IV	MLK
Porcine	USA	III	III	IB




The Batch Number on this certificate is synonymous with the Lot Number shown on the product label.
BD Diagnostics - Diagnostic Systems products are manufactured in ISO 13485:2016 Registered facilities. In addition, BD Diagnostics - Diagnostic Systems facilities are registered with the United States Food and Drug Administration (FDA), and are regulated by the FDA's Quality System Regulations (QSRs). This product met BDES stringent quality standards at time of batch/lot release. Any test results

Creation Date: 2019/07/12 14:43:40

ANEXO L. CERTIFICADO DE ANALISIS CEPA ATTC25922

Microbiology	
Certificate of Analysis: Lysophilized Microorganism Specification and Performance Upon Reuse Specifications Microorganism Name: <i>Escherichia coli</i> Catalog Number: 5335 Lot Number: 135-554** Reference Number: ATCC® 25922™ Purity: Pure Passage from Reference: 3	
Expiration Date: 2021/10/31 Release Information: Quality Control Technologist: Tracy A. Blenker Release Date: 2019/1/11	
Performance Macroscopic Features: 2 colony types, both are gray & beta hemolytic; one is circular to irregular, convex, μ ggs edge & smooth; other is larger, irregular, low convex, entire edge & rough. Microscopic Features: Gram negative straight rod. ID System: MALDI-TOF (1) See attached ID System results document.	Medium: SBAP Method: Gram Stain (1) Other Features/Challenges: Results (1) Catalase (30sec): negative Beta-glucuronidase (<i>E. coli</i> Strain w/ATCC): positive (1) Ampicillin (10 mcg - Disk Susceptibility): 15 - 22 mm (1) Gentamicin (10 mcg - Disk Susceptibility): 19 - 26 mm (1) SXT (1,2003.75 mcg - Disk Susceptibility): 23 - 29 mm
*Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number. Note for Users: Although the Vial(s) appear(s) to be aseptically sealed, the unique environment of the vial, 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.	
  	
(1) The ATCC Licensed Distributor, the ATCC Licensed Distributor logo mark and the ATCC logo mark are trademarks of ATCC. Microbiology, Inc. It is advised to use these trademarks and to call products derived from ATCC® products. (2) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.	
© 2012 Microbiology, Inc. All Rights Reserved. 200 Cooper Avenue North Saint Cloud, MN 56303 Page 1 of 1 DCC-296	

ANEXO M. CERTIFICADO DE ANALISIS CEPA ATTC29212

Microbiology	
Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Reuse Specifications Microorganism Name: <i>Enterococcus faecalis</i> Catalog Number: 5366 Lot Number: 356-357** Reference Number: ATCC® 29212™ Purity: Pure Passage from Reference: 3	
Expiration Date: 2021/9/30 Release Information: Quality Control Technologist: Mary L. Bowman Release Date: 2019/1/14	
Performance Macroscopic Features: Small to medium, gray/white, translucent, smooth, circular with entire edge. Microscopic Features: Gram positive coccid cells, mostly in pairs or short chains. ID System: MALDI-TOF (1) See attached ID System results document.	Medium: SBAP Method: Gram Stain (1) Other Features/Challenges: Results (1) Catalase (3% Hydrogen Peroxide): negative (1) Bile Esculin Agar: positive (1) Streptomycin (300 mcg - Disk Susceptibility): 14 - 20 mm (1) Gentamicin (10 mcg - Disk Susceptibility): 16 - 23 mm (1) SXT (1,2003.75 mcg - Disk Susceptibility): >= 20 mm BHNA w/Vancomycin (8 mcg/16): Sensitive
*Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number. Note for Users: Although the Vial(s) appear(s) to be aseptically sealed, the unique environment of the vial, 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.	
  	
(1) The ATCC Licensed Distributor, the ATCC Licensed Distributor logo mark and the ATCC logo mark are trademarks of ATCC. Microbiology, Inc. It is advised to use these trademarks and to call products derived from ATCC® products. (2) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.	
© 2012 Microbiology, Inc. All Rights Reserved. 200 Cooper Avenue North Saint Cloud, MN 56303 Page 1 of 1 DCC-296	

ANEXO N. CERTIFICADO DE ANALISIS ESCALA MC FARLAND

HARDY DIAGNOSTICS
— CERTIFICATE OF ANALYSIS —
— LABORATORY PERFORMANCE —

Product Name:	Advanced Jones Escala 4.0
Container Size:	1400/500ml with 4000 LBS
Category No.:	Multi
Lot No.:	408843
Expiry Date:	12/31/2020
Lot/Serial No.:	40888000

This product is supplied by Hardy Diagnostics to comply with the quality requirements of the U.S. Food and Drug Administration (FDA) Quality System Regulation (21 CFR 312.60) and the Manufacturing Practice (GMP) contained in 21 CFR 312.61 for use of Food and Drug Administration (FDA) Quality System Regulation (21 CFR 312.60) for the purpose of manufacturing conditions as required, and to ensure compliance with the FDA Quality System Regulation (21 CFR 312.60) for the purpose of manufacturing conditions as required.

Representative samples of this lot were tested and found to meet the quality requirements and certified as the baseline for the lot. In the event of a problem with the lot, Hardy Diagnostics will notify the customer. In addition, the lot conforms to the quality requirements of the FDA Quality System Regulation (21 CFR 312.60) and the Manufacturing Practice (GMP) contained in 21 CFR 312.61 for use of Food and Drug Administration (FDA) Quality System Regulation (21 CFR 312.60) for the purpose of manufacturing conditions as required, and to ensure compliance with the FDA Quality System Regulation (21 CFR 312.60) for the purpose of manufacturing conditions as required.

Autoclave Testing
This product is tested for autoclave stability and is not to be used for autoclave performance testing with autoclaves.

Acceptance Testing
This product is tested in the absence of the lot.

Lot/Serial No.: 40888000
Lot/Serial No.: 40888000
Lot/Serial No.: 40888000

Manufacturing Facility
Hardy Diagnostics continues manufacturing facilities in San Mateo, California and Springfield, MA. The manufacturing facilities can be identified from the lot number. If the lot number begins with the number 1, 2, or 3, the product was manufactured in Springfield, MA. If the lot number begins with the number 4, or higher, the lot number was manufactured in San Mateo, California.

[Signature]
Tina King
Sales & Technical Support
Hardy Diagnostics

Address:
1. Performance Standards for Analytical Methods (PAM) (21 CFR 312.60) (21 CFR 312.60) and Laboratory Methods (21 CFR 312.61) - Hardy Diagnostics, Wayne, PA
2. United States Pharmacopoeia (USP) for Bacteriological (21 CFR 312.61) (21 CFR 312.61) and Laboratory Methods (21 CFR 312.61) - Hardy Diagnostics, Wayne, PA

COM-000000

ANEXO O. CERTIFICADO DE ANÁLISIS AGAR SANGRE DE CORDERO

MEDIBAC LABORATORIO
REC-04 Fecha: 16/07/2020
Pag 1/1

CERTIFICADO DE CONTROL DE CALIDAD

LABORATORIO MEDIBAC
Av. Los Agaves 1111 entre
Iglesia y Laureles Guayaquil
Ecuador

Fecha de Emisión: 11/11/2020

Elaborado por:
Coordinador de Calidad

Revisado por:
Coordinador de Calidad

CONTROL DE CALIDAD MEDIOS DE CULTIVO

NOMBRE DEL MEDIO: AGAR SANGRE DE CORDERO

OBJETIVO: Medio de cultivo utilizado para la recuperación y aislamiento de bacterias enterocólicas de crecimiento débil y detección de hemólisis.

Nota: Basados en Norma CLSI M22-A3

COTP: AG10120
J. ELAR 20/11/2019
J. EXP: 16/12/2020

ASPECTOS FÍSICOS DEL MEDIO		RESULTADOS
Apariencia	Medio sólido de color rojo, homogéneo en placa de petri.	CUMPLE
Color del medio sólido	Rojo brillante	CUMPLE
Consistencia	La consistencia del medio debe ser ligeramente dura, pero no debe ser tan firme como la de las muestras sin crecer.	CUMPLE
Volúmenes del medio	El medio debe dar con una capa de 4-5 mm de espesor en placa de petri.	CUMPLE
Tenacidad	El medio debe ser completamente homogéneo en el presentador y resistir al burlado por el operador al ser usado.	CUMPLE
Estabilidad	El medio antes de usarlo debe estar libre de cualquier crecimiento bacteriano.	CUMPLE

PRUEBAS DE CRECIMIENTO

MICROORGANISMOS	ATCC	MODULO A PASAR DEL TUBO US DE LA ESCALA DE MC FARLAND	RESULTADOS
Streptococcus pyogenes	10615	1/1000	Se observó crecimiento abundante con hemólisis tipo beta
Staphylococcus aureus	25923	1/1000	Se observó crecimiento abundante
Escherichia coli	25922	1/1000	Se observó crecimiento abundante
Candida albicans	30231	1/1000	Se observó crecimiento abundante
Enterococcus faecalis	39422	1/1000	Se observó crecimiento abundante

COMPORTAMIENTO: EL MEDIO FUNCIONA CORRECTAMENTE. N X NO

NOTA: LOS MEDIOS DE CULTIVO PREPARADOS ESTAN LISTOS PARA SU USO, NO DEBEN SER INCUBADOS. ESTE PROCEDIMIENTO VA FUER EFECTUANDO EN LAS INSTALACIONES DE MEDIBAC LAB.

[Signature]
TDC: Geyda Hernández
Coord. Calidad

[Signature]
OF: Juan Cedeño
Inspector de Calidad

ANEXO P. CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN INCUBADORA BIOBASE 45°C

CERTIFICADO DE CARACTERIZACIÓN			
Certificado No.	AMB-ISO-MEJ-108-20		
Pedro Freile 904-111 y Juan García, Cotacollpa Quito-Ecuador Tlf: 6037779			
			
IDENTIFICACIÓN DEL CLIENTE			
Cliente:	Ambientab Servicios Ambientales y Laborales Cía. Ltda.		
Dirección:	Juan González N35-26 y Juan Pablo Soto, 58800 Torres Viciaya, Torre norte Piso 2.		
Persona de contacto:	Quím. Daniel Solís		
Fecha de caracterización:	2020-09-14		
Fecha de emisión:	2020-09-18		
Próxima caracterización:	No definida		
IDENTIFICACIÓN DE EQUIPOS			
Instrumento / Equipo:	Medio isotermo		
Código:	AMB-EQ-090		
Tipo:	Incubadora		
Marca:	BioBase		
Modelo:	BIPY-A2150		
Serie:	05011907		
Unidad de medida:	°C		
Rango:	(5 a 50)°C		
División de escala:	0,1		
CONDICIONES AMBIENTALES			
Temperatura inicial:	22,7 °C		
Temperatura final:	22,7 °C		
Humedad relativa:	64,0 %		
Lugar de caracterización:	Laboratorio Ambientab		
MÉTODO UTILIZADO:			
Procedimiento para la Caracterización de Medios Isotermos TM-OM-04			
PATRONES UTILIZADOS			
NOMBRE:	Temperatura 12 canales	Temperatura estándar	-
CÓDIGO:	TM-029 / (T1 a T5)	TM-T-105	-
MARCA:	Extech	Tyler	-
MODELO:	TMS00	1732	-
FECHA CALIBRACIÓN:	2020-02-09	2020-07-04	-
FECHA VALIDACIÓN:	2021-02-08	2021-07-04	-
CERTIFICADO No.:	TEG-LAB-TE-117 al 121-20	TEG-LAB-TM-008-20	-
DESCRIPCIÓN DE LA CARACTERIZACIÓN			

ANEXO Q. PRUEBA DE HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS DE COCHRAN

Prueba de homogeneidad de varianzas de Cochran														
$\alpha = 0.05$														
n														
k	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	17	37	145	1000
2	0.998	0.975	0.939	0.905	0.877	0.853	0.833	0.815	0.801	0.788	0.734	0.660	0.581	0.500
3	0.966	0.870	0.797	0.745	0.707	0.677	0.653	0.633	0.616	0.602	0.546	0.474	0.403	0.333
4	0.906	0.767	0.684	0.628	0.589	0.559	0.536	0.517	0.501	0.488	0.436	0.372	0.309	0.250
5	0.841	0.683	0.598	0.544	0.506	0.478	0.456	0.438	0.424	0.411	0.364	0.306	0.251	0.200
6	0.780	0.616	0.532	0.480	0.444	0.418	0.398	0.381	0.368	0.336	0.313	0.261	0.211	0.166
7	0.727	0.561	0.480	0.430	0.397	0.372	0.353	0.338	0.352	0.315	0.275	0.227	0.183	0.142
8	0.679	0.515	0.437	0.391	0.350	0.336	0.318	0.304	0.292	0.282	0.246	0.202	0.161	0.125
9	0.638	0.477	0.402	0.358	0.328	0.306	0.290	0.276	0.265	0.256	0.222	0.182	0.144	0.111
10	0.602	0.445	0.373	0.331	0.302	0.282	0.266	0.254	0.243	0.235	0.203	0.165	0.130	0.100

Fuente: Correa, 2006, p.57.

ANEXO R. VALORES CRÍTICOS DE F DE FISHER

Tabla A.3. Valores críticos de F para un contraste de una cola ($P = 0.05$).

v_2	v_1												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20
1	161.4	199.5	215.7	224.6	230.2	234.0	236.8	238.9	240.5	241.9	243.9	245.9	248.0
2	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.38	19.40	19.41	19.43	19.45
3	10.13	9.552	9.277	9.117	9.013	8.941	8.887	8.845	8.812	8.786	8.745	8.703	8.660
4	7.709	6.944	6.591	6.388	6.256	6.163	6.094	6.041	5.999	5.964	5.912	5.858	5.803
5	6.608	5.786	5.409	5.192	5.050	4.950	4.876	4.818	4.772	4.735	4.678	4.619	4.558
6	5.987	5.143	4.757	4.534	4.387	4.284	4.207	4.147	4.099	4.060	4.000	3.938	3.874
7	5.591	4.737	4.347	4.120	3.972	3.866	3.787	3.726	3.677	3.637	3.575	3.511	3.445
8	5.318	4.459	4.066	3.838	3.687	3.581	3.500	3.438	3.388	3.347	3.284	3.218	3.150
9	5.117	4.256	3.863	3.633	3.482	3.374	3.293	3.230	3.179	3.137	3.073	3.006	2.936
10	4.965	4.103	3.708	3.478	3.326	3.217	3.135	3.072	3.020	2.978	2.913	2.845	2.774
11	4.844	3.982	3.587	3.357	3.204	3.095	3.012	2.948	2.896	2.854	2.788	2.719	2.646
12	4.747	3.885	3.490	3.259	3.106	2.996	2.913	2.849	2.796	2.753	2.687	2.617	2.544
13	4.667	3.806	3.411	3.179	3.025	2.915	2.832	2.767	2.714	2.671	2.604	2.533	2.459
14	4.600	3.739	3.344	3.112	2.958	2.848	2.764	2.699	2.646	2.602	2.534	2.463	2.388
15	4.543	3.682	3.287	3.056	2.901	2.790	2.707	2.641	2.588	2.544	2.475	2.403	2.328
16	4.494	3.634	3.239	3.007	2.852	2.741	2.657	2.591	2.538	2.494	2.425	2.352	2.276
17	4.451	3.592	3.197	2.965	2.810	2.699	2.614	2.548	2.494	2.450	2.381	2.308	2.230
18	4.414	3.555	3.160	2.928	2.773	2.661	2.577	2.510	2.456	2.412	2.342	2.269	2.191
19	4.381	3.522	3.127	2.895	2.740	2.628	2.544	2.477	2.423	2.378	2.308	2.234	2.155
20	4.351	3.493	3.098	2.866	2.711	2.599	2.514	2.447	2.393	2.348	2.278	2.203	2.124

v_1 = número de grados de libertad del numerador y v_2 = número de grados de libertad del denominador.

Fuente: Arrondo, 2014, p.189.

ANEXO S. DISTRIBUCIÓN T DE STUDENT

GRADOS DE LIBERTAD	Sig. 0,10 (Conf. 90%)	Sig. 0,09 (Conf. 91%)	Sig. 0,08 (Conf. 92%)	Sig. 0,07 (Conf. 93%)	Sig. 0,06 (Conf. 94%)	Sig. 0,05 (Conf. 95%)	Sig. 0,04 (Conf. 96%)	Sig. 0,03 (Conf. 97%)	Sig. 0,02 (Conf. 98%)	Sig. 0,01 (Conf. 99%)
1	6,31375151	7,02636623	7,91581509	9,05788668	10,57889499	12,70620473	15,89454484	21,20494879	31,82051595	63,65674115
2	2,91998558	3,10397669	3,31976405	3,57824664	3,89642536	4,30265273	4,84873221	5,64277835	6,96455673	9,92484320
3	2,35336343	2,47080680	2,60542682	2,76259896	2,95051047	3,18244630	3,48190876	3,89604593	4,54070286	5,84090931
4	2,13184678	2,22609956	2,33287256	2,45589199	2,60076199	2,77644511	2,99852787	3,29762973	3,74694739	4,60409487
5	2,01504837	2,09783667	2,19095826	2,29739233	2,42158471	2,57058183	2,75650852	3,00287497	3,36493000	4,03214298
6	1,94318027	2,01920079	2,10430612	2,20105893	2,31326330	2,44691185	2,61224185	2,82892786	3,14266840	3,70742802
7	1,89457860	1,96615295	2,04601110	2,13645290	2,24087929	2,36462425	2,51675242	2,71457301	2,99795157	3,49948330
8	1,85954803	1,92798552	2,00415154	2,09016601	2,18915480	2,30600413	2,44898499	2,63381437	2,89645945	3,35538733
9	1,83311292	1,89922181	1,97265265	2,05539486	2,15037527	2,26215716	2,39844098	2,57380398	2,82143792	3,24983554
10	1,81246110	1,87677438	1,94809946	2,02832701	2,12023353	2,22813884	2,35931462	2,52748424	2,76376946	3,16927267
11	1,79588481	1,85877196	1,92842682	2,00666275	2,09613884	2,20098516	2,32813983	2,49066393	2,71807918	3,10580651
12	1,78228755	1,84401511	1,91231330	1,98893350	2,07644062	2,17881283	2,30272167	2,46070016	2,68099799	3,05453959
13	1,77093338	1,83169976	1,89887447	1,97415795	2,06003806	2,16036865	2,28160356	2,43584520	2,65030884	3,01227583
14	1,76131012	1,82126695	1,88749614	1,96165567	2,04616906	2,14478668	2,26378128	2,41489772	2,62449406	2,97684273
15	1,75305033	1,81231608	1,87773866	1,95094007	2,03428939	2,13144954	2,24854029	2,39700504	2,60248029	2,94671288
16	1,74588367	1,80455261	1,86927903	1,94165406	2,02400018	2,11990529	2,23535842	2,38154537	2,58348718	2,92078162
17	1,73960672	1,79775516	1,86187466	1,93352971	2,01500233	2,10981556	2,22384530	2,36805476	2,56693397	2,89823052
18	1,73406359	1,79175407	1,85533985	1,92636204	2,00706731	2,10092204	2,21370324	2,35618000	2,55237962	2,87844047
19	1,72913279	1,78641723	1,84953003	1,91999158	2,00001746	2,09302405	2,20470134	2,34564753	2,53948319	2,86093460
20	1,72471822	1,78164021	1,84433093	1,91429242	1,99371260	2,08596344	2,19665773	2,33624215	2,52797700	2,84533971
21	1,72074287	1,77733934	1,83965113	1,90916383	1,98804062	2,07961384	2,18942727	2,32779232	2,51764801	2,83135955
22	1,71714434	1,77344686	1,83541656	1,90452428	1,98291086	2,07387306	2,18289265	2,32015957	2,50832455	2,81875606
23	1,71387152	1,76990726	1,83156660	1,90030700	1,97824915	2,06865760	2,17695811	2,31323095	2,49986674	2,80733568
24	1,71088207	1,76667465	1,82805115	1,89645689	1,97399426	2,06389855	2,17154467	2,30691339	2,49215947	2,79693950
25	1,70814075	1,76371076	1,82482845	1,89292801	1,97009521	2,05953854	2,16658663	2,30112952	2,48510717	2,78743581
26	1,70561790	1,76098348	1,82186339	1,88968180	1,96650913	2,05552942	2,16202886	2,29581451	2,47862982	2,77871452
27	1,70328842	1,75846550	1,81912629	1,88668561	1,96319983	2,05183049	2,15782481	2,29091360	2,47265990	2,77068295
28	1,70113091	1,75613366	1,81659183	1,88391164	1,96013646	2,04840711	2,15393486	2,28638022	2,46714009	2,76326244
29	1,69912700	1,75396805	1,81423832	1,88133605	1,95729260	2,04522961	2,15032507	2,28217456	2,46202135	2,75638590
30	1,69726085	1,75195152	1,81204710	1,87893831	1,95464548	2,04227245	2,14696626	2,27826232	2,45726153	2,74999565

Fuente: La interpolación lineal en la distribución T, 2009, p.224.

ANEXO T: CERTIFICADO DE CUMPLIMIENTO DE NORMATIVA



esPOCH | Dirección de Bibliotecas y
Recursos del Aprendizaje

UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y DOCUMENTAL

REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA

Fecha de entrega: 03 / 03 / 2022

INFORMACIÓN DEL AUTORA (S)
Nombres – Apellidos: <i>Johanna Estefanía Sambachi Chacón</i>
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL
Facultad: <i>Ciencias</i>
Carrera: <i>Química</i>
Título a optar: <i>Química</i>
f. Analista de Biblioteca responsable: <i>Ing. Leonardo Medina Ñuste MSc.</i>

LEONARDO
FABIO MEDINA
NUSTE

Firmado digitalmente por LEONARDO FABIO
MEDINA NUSTE
Nombre de reconocimiento (DN): c=EC, o=BANCO
CENTRAL DEL ECUADOR, ou=ENTIDAD DE
CERTIFICACION DE INFORMACION-ECIBCE,
j=QUITO, serialNumber=0000621485,
cn=LEONARDO FABIO MEDINA NUSTE
Fecha: 2022.03.03 09:57:29 -05'00'



0377-DBRA-UTP-2022