



ISSN: 2145-5333

Vol. 2 No. 1, diciembre de 2010 pp. 21-30

ARTÍCULO ORIGINAL

Recibido para publicación: noviembre 27 de 2010
Aceptado en forma revisada: diciembre 09 de 2010

Validación de la técnica de recuento de coliformes totales y *e. coli* por el método filtración de membrana en el laboratorio de control de calidad de aguas de Cartagena s.a e.s.p.

Validation of the total coliform and *e. coli* counting technique by the membrane filtration method in the quality control laboratory of aguas de cartagena sa esp

[Elles N, Elincer](#)¹, Salcedo O, Mayra², Muñoz P, Mauricio³, Mendoza A, Raúl³

RESUMEN

Introducción: La normativa colombiana a través de la resolución 2115 de 2007 estipula que al agua potable se debe investigar bacteriológicamente Coliformes totales y *Escherichia coli* como indicadores de la calidad sanitaria. **Objetivo:** El objetivo de este trabajo es validar la técnica de recuento de coliformes totales y *E. coli* por el método filtración de membrana, aplicando parámetros estadísticos (precisión e incertidumbre) con el fin de generar confiabilidad en los resultados que se emitan. **Materiales y Métodos:** El estudio fue de tipo analítico, donde se estudiaron los factores que pudieran influir en los resultados y con base en ellos, aplicar los diferentes parámetros estadísticos; el procedimiento se realizó a partir de ensayos normalizados y protocolos de validación. **Resultados:** Los resultados de criterio de precisión fueron en la concentración de 5 ufc/mL: 0.79, 0.71, 0.76; Concentración de 60 ufc/mL de *E. coli*: 0.29, 0.08, 0.16; Concentración de 5 ufc/mL de *E. aerogenes*: 0.84, 0.76, 0.71 y para la concentración de 60 ufc/mL *E. aerogenes*: 0.29, 0.08, 0.16. El resultado obtenido de la incertidumbre de los datos de la concentración de 5 ufc/mL fue de 0.41 y para la concentración de 60 ufc/mL igual a 1.32 tanto para *E. coli* como para *E. aerogenes*. **Conclusión:** A partir de la evaluación de la precisión de la técnica de coliformes totales y *E. coli* por medio del método filtración de membrana se obtuvieron resultados satisfactorios demostrando que la técnica es repetible y reproducible por lo cual cumple con este parámetro estadístico.

¹ Bacterióloga, Docente del Programa de Bacteriología de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Corporación Universitaria Rafael Núñez. ²

Bacterióloga egresada del Programa de Bacteriología de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Corporación Universitaria Rafael Núñez. ³ Laboratorio de control de calidad de aguas de Cartagena, área de microbiología Cartagena- Colombia.

Correspondencia: elincer.elles@curnvirtual.edu.co

Palabras Claves: Coliformes totales, *E. coli*, agua potable, calidad sanitaria, precisión.

ABSTRACT

Introduction: The Colombian legislation through resolution 2115 of 2007 stipulates that drinking water should be investigated bacteriologically total coliforms and *Escherichia coli* as indicators of sanitary quality. **Objective:** The aim of this work is to validate the technique of total coliform count and *E. coli* by membrane filtration method, using statistical parameters (precision and uncertainty) in order to generate confidence in the results being issued. **Materials and Methods:** The study is analytical, we considered factors that might influence the results and based on them, applying different statistical parameters and the procedure is performed from standardized testing and validation protocols. **Results:** The results of accuracy criteria were in the concentration of 5 cfu/mL: 0.79, 0.71, 0.76, concentration of 60 cfu/mL of *E. coli*: 0.29, 0.08, 0.16; concentration of 5 cfu/mL *E. aerogenes*: 0.84, 0.76, 0.71 and the concentration of 60 cfu/mL *E. aerogenes*: 0.29, 0.08, 0.16. The result of the uncertainty of the data on the concentration of 5 cfu/mL was 0.41 and the concentration of 60 cfu/mL equal to 1.32 for *E. coli* and *E. aerogenes*. **Conclusion:** Based on the evaluation of the accuracy of the technique of total coliform and *E. coli* by membrane filtration method were obtained satisfactory results showing that the technique is repeatable and reproducible therefore complies with this statistic.

Keywords: Total coliforms, *E. coli*, drinking water, sanitary quality, precision.

INTRODUCCIÓN

El agua para el consumo humano debe ser de excelente calidad, la cual inicia desde su origen natural, el recorrido hasta la planta de tratamiento, los procesos realizados en esta, hasta su llegada al servicio domiciliario. A pesar de ello, las enfermedades de origen hídrico son frecuentes en los países en desarrollo, por lo que los estudios de la bacteriología del agua se han orientado en su mayor parte hacia el aspecto sanitario de la misma [1].

En Colombia el Decreto 1575 de 2007 del Ministerio de Protección Social, establece el Sistema para la Protección y Control de la Calidad del Agua para Consumo Humano [2]. Además, a través de la Resolución 2115 de 2007 estipula que en el agua potable se debe investigar bacteriológicamente Coliformes totales y *Escherichia coli* como indicadores de la calidad sanitaria [3]. Su presencia en el agua se considera un índice evidente de la ocurrencia de polución fecal y, por tanto, de contaminación con organismos patógenos [4]. Considerando la importancia que tiene el agua para consumo humano, los laboratorios de análisis microbiológico de agua potable deben implementar procedimientos que permitan emitir resultados confiables a sus clientes.

El método utilizado en el laboratorio de Aguas de Cartagena para el recuento de coliformes totales y *E. coli* es el de Filtración por Membrana, el cual es aceptado y utilizado a nivel nacional e internacional por los entes reguladores debido a su fácil manejo y empleo, descrito por la APHA-AWWA-WPCF "Standard Methods" 1992 [5]. Este método debe emitir resultados confiables, por lo que el laboratorio además de

realizar controles internos de calidad, debe validarlo con el fin de que sus resultados sean confiables [6-7].

La validación es el proceso mediante el cual se ofrece evidencia de que a través de un método o técnica se puede detectar o cuantificar un grupo microbiano específico con una adecuada precisión y exactitud. Con la validación se pueden determinar las posibles variaciones que se presentan en diferentes números de ensayos y de esta manera disminuir las posibilidades de error dentro de la técnica relacionados con el personal, el instrumental, los suministros y la metodología analítica utilizada, errores que generarían graves consecuencias para la empresa al no proporcionar un alto grado de confianza en los resultados obtenidos [8-11].

CSV: Vol. 2 No.1 Año 2010.

Por ello, en este trabajo se validó la técnica de recuento de coliformes totales y *E. coli* por el método filtración de membrana, aplicando parámetros estadísticos (precisión e incertidumbre) con el fin de generar confiabilidad en los resultados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la realización de este trabajo se utilizaron los equipos, materiales y reactivos apropiados y de uso habitual en el laboratorio de Aguas de Cartagena.

Validación de la técnica de coliformes totales y *E. coli* por el método de Filtración por Membrana. Antes de la validación, y como se recomienda, fueron realizados diversos controles [12-15].

Controles realizados:

Equipos e instrumental de laboratorio

Se llevaron a cabo con regularidad las tareas de mantenimiento del equipo, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Control de calidad de los medios de cultivo

A los medios de cultivo utilizados (Chromocult, Mac Conkey, Plate count, Extracto de malta) se les realizó prueba de esterilidad y control de crecimiento de microorganismos en el medio.

Prueba de esterilidad. Una vez preparados los medios de cultivo según las indicaciones de la casa comercial, se escogió al azar una caja por cada lote de preparación y se sometieron a un proceso de esterilización (15 minutos si era requerido), posteriormente se incubaron a 37°C por 24 horas, al no haber crecimiento de microorganismos significaba que la prueba de esterilidad era apta.

Control de crecimiento de microorganismos. De los diferentes medios de cultivo preparados fueron separados aleatoriamente cinco cajas de petri para realizar el control

de crecimiento. Fueron realizados controles positivo y negativo, utilizando cepas de referencia certificadas.

Control de calidad ambiental microbiológico. Para evaluar la calidad y efectividad de la limpieza y desinfección cada mes se llevó a cabo un control ambiental [16-17], para lo cual se utilizaron medios de cultivo Mac Conkey, Plate count, Extracto de malta, con el fin de determinar la presencia de bacterias Gram negativas, aerobios mesófilos y hongos, en las cinco secciones de trabajo del área de microbiología del laboratorio de control de calidad de Aguas de Cartagena; cabina, siembra y recuento, recepción de muestras, preparación de medios y esterilización. Para aerobios mesófilos y hongos se realizó el método de deposición gravitacional colocando cajas de petri de Plate count y extracto de malta abiertas durante 15 minutos en las zonas descritas anteriormente, excepto la cabina de flujo laminar, en la cual el tiempo de exposición fue de una hora. Para determinar bacterias gram negativas, se hizo un frotis utilizando escobillones humedecidos en agua peptonada al 0.1%, frotándolos sobre la superficie de los mesones y sembrando en medio Mac Conkey.

Elles N, Elincer.

Control biológico. Con el fin de verificar la efectividad de los procesos de esterilización, se realizaron controles biológicos. Se utilizaron indicadores biológicos comerciales, los cuales se sometieron al proceso de esterilización y se incubaron a una temperatura de 55°C junto al control positivo. Luego de 48h de incubación se interpretaron los resultados según el fabricante.

Determinación de la precisión del método. Para llevar a cabo el proceso de validación se evaluaron los parámetros de precisión e incertidumbre. Se calculó la precisión de los análisis de acuerdo con el procedimiento establecido en el Standard Methods (Métodos normalizados para el análisis de agua potable y residuales), evaluando la repetibilidad y la reproducibilidad aplicada a los resultados obtenidos de la siembra de la suspensión bacteriana.

Se calculó la precisión de los análisis de acuerdo con el siguiente procedimiento, siguiendo lo establecido por Martínez de Bascaran, 1985:

- 1) Realización de análisis duplicados de la muestra. Cada grupo de duplicado es analizado por el mismo analista.
- 2) Se calculó el logaritmo de cada resultado.
- 3) Se calculó el rango (R) de cada par de duplicados (Tabla 1).
- 4) La sumatoria de los datos del rango de logaritmos se dividió entre el número de datos, y el resultado se multiplicó por una constante ($3.27 R$), el resultado no debe ser mayor de 3.27. Se determinó si era aceptable o no el criterio de precisión; de no ser así, se desestimaría cualquier resultado analítico obtenido desde la última comprobación de la precisión.
- 5) Se actualizó el criterio utilizado en el apartado anterior repitiendo de forma periódica los procedimientos indicados en los apartados 1, 2 y 3; se utilizaron para ello los resultados de duplicados más recientes.

Tabla 1. Cálculo del criterio de precisión

Muestra n	Análisis duplicado	Logaritmos de los recuentos	Rango de logaritmos (R log.).
	D1 D2	L1 L2	(L1-L2)

Estandarización del tubo 0.5 de la escala de McFarland. Antes de realizar la etapa de validación se estandarizó la lectura del tubo 0.5 de la escala de McFarland, a fin de establecer la concentración de la cual se estaba partiendo [16,19-20].

La preparación del tubo 0.5 de la escala de McFarland se realizó de acuerdo al protocolo establecido por la Organización Panamericana de la Salud en el Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana.

La suspensión de cepas certificadas se hizo en 60 mL de solución salina estéril en la cual se inocularon varias colonias de *E. coli* y *E. aerogenes* (coliforme total), se leyó la absorbancia y el resultado fue comparado con la absorbancia del tubo 0.5 de la escala de McFarland. Se tomó el tubo de la suspensión y se realizaron diferentes diluciones, el tubo 0.5 tuvo una concentración de 10^6 ufc/mL a 10^8 ufc/mL.

CSV: Vol. 2 No.1 Año 2010.

Las diluciones se hicieron partiendo del tubo de la suspensión agregando 1 mL del frasco de la suspensión al tubo de la dilución 15×10^5 ufc/mL que contenía 99 mL de agua peptonada estéril y se completó el volumen a 100 mL. De esta dilución se tomó 1 ml para la dilución de 15×10^3 ufc/mL y de esta 1 ml para la dilución de 15×10^1 ufc/mL. Una vez obtenidas las diferentes diluciones se tomó la dilución menor (150 ufc/mL).

Ensayo de repetibilidad. Para realizar este ensayo primero se estableció que la concentración inicial de la suspensión de cepas certificadas fue de 15×10^7 (150.000.000 ufc/mL), a partir de la suspensión se realizaron las diferentes diluciones 15×10^5 (1.500.000 ufc/mL), 15×10^3 (15.000 ufc/mL), 15×10^1 (150 ufc/mL). La menor dilución fue utilizada para llegar a una concentración de 5 ufc/mL y 60 ufc/mL; teniendo en cuenta en todo el proceso de validación, la concentración del tubo 0.5 de la escala de McFarland [7].

Para la consecución de las concentraciones necesarias se utilizó la fórmula $V1 \times C1 = V2 \times C2$. Para llegar a 5 ufc/mL se tomaron 0.33 mL de la dilución de 10^1 y se completó el volumen con 9.67 mL de agua destilada estéril; y para la concentración de 60 ufc/mL se tomaron 4 mL de la dilución bacteriana y se completó el volumen con 6 mL de agua destilada estéril. En cada una de las cajas de medio de cultivo, se sembró 1 mL de cada suspensión de 5 y 60 ufc/mL.

Para evaluar la repetibilidad se realizaron mediciones sucesivas por el mismo analista el mismo día, mismos reactivos, mismo instrumento y condiciones de medición sembrando 6 duplicados, 12 cajas de Chromocult para *E. coli*, 12 cajas de Chromocult

para *E. aerogenes* para la concentración de 5 ufc/mL. Así mismo, se hicieron 12 cajas de Chromocult para *E. coli*, 12 cajas de Chromocult para *E. aerogenes* para la concentración de 60 ufc/mL.

Para los resultados finales de cada analista se estableció un promedio, criterio de precisión y la incertidumbre. Se aplicaron todos los parámetros estadísticos y se analizaron los resultados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CONTROLES DE CALIDAD

Control de equipos. Al revisar todos los registros de cada uno de los equipos estos se encontraban funcionando correctamente y aptos para su uso.

Control de calidad de los medios de cultivo.

Prueba de esterilidad. Fue satisfactoria pues no hubo crecimiento de ningún tipo de microorganismo.

Control de crecimiento de microorganismos en el medio. Se observó el crecimiento de *E. coli* (colonias azul-violetas) en agar Chromocult y la inhibición del crecimiento de *S. aureus*. También hubo crecimiento de *E. aerogenes* en medio Mc Conkey y la inhibición

Elles N, Elincer.

de *S. aureus*, crecimiento de *E. coli* en medio Plate count y crecimiento de *Aspergillus* en extracto de malta y la inhibición de *S. aureus*, comprobando la efectividad de los medios de cultivo.

Control de calidad ambiental microbiológico. Por el método de deposición gravitacional se obtuvo tanto para mesófilos como para hongos <15 ufc. Para bacterias gram negativas se encontró escasez o nulo crecimiento de ufc. Por lo que se afirma que los resultados obtenidos nos permitieron confirmar la calidad y la efectividad de la limpieza y desinfección.

Control biológico. Todos los 9 controles biológicos realizados fueron satisfactorios lo que permitió tener confiabilidad al realizar el proceso de esterilización.

Validación de la técnica de coliformes totales y *E. coli* por el método de filtración por membranas en el laboratorio de control de calidad de aguas de cartagena

Estandarización del tubo 0.5 de la escala de McFarland. Luego de la preparación del tubo 0.5 de la escala de McFarland se realizaron 10 mediciones a 620nm para obtener un rango de absorbancias que estuvo entre 0.152-0.157 (Tabla 2).

Tabla 2. Absorbancias del tubo 0.5 de la escala de McFarland

Tubo 0.5 de la escala de McFarland	Suspensión de <i>E. coli</i>	Suspensión de <i>E. aerogenes</i>
0.152-0.157	0.154	0.155

Era necesario que el valor de la absorbancia de la suspensión de cepas certificadas fuera lo más aproximado a la absorbancia del tubo 0.5 de la escala de McFarland [2122]. Para saber que se estaba partiendo de esa concentración se realizaron diferentes ensayos (Pruebas pilotos) que permitieron establecer esto (Tabla 3).

Tabla 3. Absorbancia del tubo 0.5 de la escala de McFarland y cepas certificadas

Absorbancia	0,5 de la escala de McFarland
	0,152
	0,154
	0,153
	0,156
	0,157
	0,155
	0,153
	0,152
	0,154
	0,155
Promedio	0,154

Ensayo de repetibilidad y reproducibilidad. En la prueba de repetibilidad se obtuvieron resultados similares en cada una de las pruebas (ver imagen 1 y 2).

CSV: Vol. 2 No.1 Año 2010.

Figura 1. Recuento de *E. coli* en concentración de 5 ufc/mL.

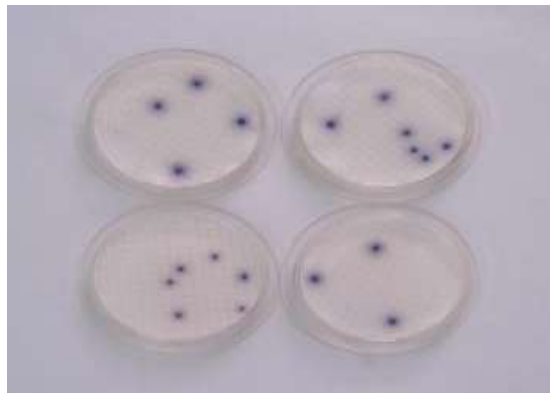


Figura 2. Recuento de *E. coli* en concentración de 60 ufc/mL.



Para evaluar la reproducibilidad se realizó el mismo procedimiento de la medición de la suspensión de 5 ufc/mL y 60 ufc/mL por diferentes analistas con el fin de determinar el grado de concordancia entre los resultados obtenidos. A los resultados finales de cada analista se les determinó el promedio, criterio de precisión individual, global (desviación estándar de la repetibilidad y reproducibilidad), la incertidumbre combinada y la incertidumbre expandida.

DETERMINACIÓN DE LA PRECISIÓN DEL MÉTODO

Cálculo del criterio de precisión

Después de aplicar los criterios establecidos por Martínez de Bascaran, se obtuvieron los datos que se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Cálculos del Criterio de Precisión

Muestra	Analista	5 ufc/mL	60 ufc/mL
Suspensión de <i>E. coli</i>	MSO	0,79	0,29
	MMP	0,71	0,08
	RMA	0,76	0,16

Elles N, Elincer.

Suspensión de <i>E. aerogenes</i>	MSO	0,84	0,05
	MMP	0,76	0,11
	RMA	0,71	0,15
Incertidumbre total de <i>E. coli</i>		0,41	1,32
Incertidumbre total de <i>E. aerogenes</i>		0.41	1.32

Determinación de la precisión

Análisis de la precisión

Al analizar los datos, calcular el rango y compararlo con la meta a alcanzar 3.27 se evidenció que los resultados son aceptables, porque todos ellos estuvieron por debajo de 3.27. Cabe resaltar que el valor más alto obtenido fue muy inferior, lo que indica que este método utilizado bajo las condiciones propias del laboratorio, es el adecuado.

Al comparar los resultados obtenidos en el criterio de precisión de cada analista se observó claramente la proximidad en ellos: En la concentración de 5 ufc/mL los resultados del criterio de precisión fueron 0.79, 0.71, 0.76; indica la cercanía entre los tres resultados, significando que la forma de procesar las muestras de cada uno de los analistas permite datos repetibles.

Para la concentración de 60 ufc/mL de *E. coli* los resultados del criterio de precisión fueron: 0.29, 0.08, 0.16; se nota una diferencia entre estos tres resultados pero lo importante es que los resultados sean menores de 3.27, lo que indica que estos son repetibles y reproducibles. Esta diferencia que no fue significativa, pudo deberse a factores externos como el cambio climático de fuertes lluvias y días soleados que pueden influir en la

Para la concentración de 5 ufc/mL de *E. aerogenes* los resultados fueron de 0.84, 0.76, 0.71 y para la concentración de 60 ufc/mL *E. aerogenes* de los resultados del criterio de precisión fueron: 0.05, 0.11, 0.15.

Al comprobar que los resultados son repetibles y reproducibles indican que la técnica de recuento de coliformes totales y *E. coli* cumple con el parámetro estadístico de precisión.

Análisis de la incertidumbre. Para dar validez a los resultados anteriores se procedió a calcular la incertidumbre de medición [23]. El resultado obtenido de la incertidumbre de los datos de la concentración de 5 ufc/mL es igual a 0.41 y la concentración de 60 ufc/mL igual a 1.32 de *E. coli* y *E. aerogenes* indican que el porcentaje de incertidumbre para cada uno de los resultados no es tan amplio, es decir que hay concordancia entre el resultado obtenido en cada una de las cajas y el valor que se esperaba encontrar. Estos resultados indican que la técnica cumple con este parámetro estadístico.

CSV: Vol. 2 No.1 Año 2010.

CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en los diferentes ensayos de repetibilidad y reproducibilidad fueron menores a 3.27, lo cual indica que la técnica es repetible y reproducible.

A partir de la evaluación de la precisión y la incertidumbre de la técnica de coliformes totales y *E. coli* se obtuvieron resultados satisfactorios demostrando que la técnica de coliformes totales y *E. coli* por medio del método Filtración por Membrana es apta para utilizarse en el laboratorio de control de calidad de Aguas de Cartagena S.A E.S.P.

BIBLIOGRAFÍA

1. Salgado MT. Microbiología de los Alimentos. Editorial Universidad de Caldas. 1 Edición. 2006. pag 34. ISBN: 9588231175.
 2. República de Colombia, Ministerio de Protección Social. Decreto 1575 (9, de Mayo de 2007). Bogotá D.C. [Diario oficial](#).
 3. República de Colombia, Ministerio de Protección Social. Resolución 2115 (22, de Junio de 2007). Bogotá D.C. [Diario oficial](#).
 4. Romero J. Calidad del Agua. Editorial Escuela Colombiana de Ingeniería. 2 Edición. 2005. Pág. 217
 5. APHA-AWWA-WPCF. 1992. Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales. American Public Health Association-American Water Works Association-Water Pollution Control Federation. Ediciones Díaz Santos, S.A. 17ª Ed. Madrid. España.
 6. Juarismy F. Estrategias para el proceso de acreditación de métodos microbiológicos. Bogotá.
 7. Ortiz, J, Palma RM, Peñaranda S. Validación del método de filtración por membrana utilizando caldo M-coliblué para la determinación simultánea de coliformes y E coli en aguas consumo humano. Bogotá. Instituto Nacional de Salud. 2004. 28p.
 8. Martínez de Bascaran, G. Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales. [Ediciones Díaz de santos.1985.211p.](#)
 9. García E. Optimización, validación y modelización de un proceso de fabricación de comprimidos al desarrollo de una aplicación interactiva multimedia. Universidad de Barcelona, España. 2001. 166 p. Disponible en: <http://tdx.cat/bitstream/handle/10803/1608/TOL82A.pdf?sequence=1>
 10. González, MI. Aseguramiento de calidad y buenas prácticas en Laboratorios de Microbiología de Aguas. Elementos básicos en la Norma ISO/IEC 17025: [INHEM, Cuba, 2008...](#)
 11. Bernier. I. Directrices sobre la estimación de la incertidumbre de la medición para determinaciones cuantitativas. Bogotá. 2007.
 12. Instituto Colombiano de Normas Técnicas. GTC 84. Calidad del agua para la orientación acerca de la validación de métodos de análisis microbiológico. Santa Fe de Bogotá D.C.2003. Disponible en: <http://www.sinab.unal.edu.co/gtc/GTC84.pdf>
 13. Europea Commission. Enterprise Directorate-General. Working party on control of medicines and inspections. Final version of annex 16 to the EU Guide to good manufacturing practice. Julio de 2001. Disponible en: http://ec.europa.eu/enterprise/sectors/pharmaceuticals/files/eudralex/vol-4/pdfsm/v4_an16_200408_en.pdf
 14. Instituto Colombiano de Normas Técnicas. ISO/IEC 17025. Requisitos generales de competencia de laboratorios de ensayos y calibración. Santa Fe de Bogotá D.C. 2001. Disponible en: <http://www.itp.gob.pe/normatividad/demos/doc/Normas%20Internacionales/Union%20Europea/ISO/ISO17025LaboratorioEnsayo.pdf>
 15. República de Colombia, Ministerio de Desarrollo Económico, Superintendencia de Industria y Comercio. Decreto 2266 (16 de Septiembre de 1996) Por el cual se organiza el Sistema Nacional de Normalización, Certificación y Metrología. Bogotá. D.C. Disponible en: <http://vlex.com.co/tags/decreto-2266-1969-216104>
 16. Valencia L. Instalaciones y condiciones ambientales. Bogotá. Curso del IDEAM (memorias). Pontificia Universidad Javeriana. 2007.
 17. Páez L. Validación secundaria del método de filtración por membrana para la detección de Coliformes totales y E. coli en muestras de agua para consumo humano analizadas en el laboratorio
- Elles N, Elincer.**
de salud pública del Huila. Pontificia universidad javeriana. Bogotá. 2008. Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis221.pdf>
18. Carrillo EM, Lozano AM. Validación del método de detección de Coliformes totales y fecales en agua potable utilizando agar Chromocult. Bogotá. Pontificia universidad javeriana.2008. 97p. Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis203.pdf>
 19. Konema E, Allen S, Jansa W, Schreckenberger PC, Winn W. Diagnóstico microbiológico texto y atlas de color, Editorial panamericana. 5ta Edición. Buenos Aires. 1997.
 20. Soler JP. Validación secundaria del método de número más probable y recuento en placa profunda para coliformes totales y fecales en muestras de alimentos basada en la norma ISO NTC 17025.

- Bogotá. Pontificia universidad javeriana, 2006. Disponible en:
<http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis273.pdf>
21. Holguín MS, Higuera R, Muñoz M. Manual de Técnicas de Análisis para Control Microbiológico de Alimentos para consumo Humano. Bogotá Colombia Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos.1998.
 22. Instituto Colombiano de Normas Técnicas. ISO 9000. Sistemas de gestión de la calidad de fundamentos y vocabulario. Disponible en:
<http://medicina.udea.edu.co/calfm/NORMATIVIDAD%20Y%20LEGISLACION/NTC-ISO9000.pdf>
 23. Padilla JE. Validación secundaria del método de recuento en placa en superficie de *Baccillus cereus* y *Staphylococcus aureus* en muestras de alimentos en un laboratorio de referencia. Pontificia universidad javeriana. Bogotá. 2007. 109p. Disponible en:
<http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis15.pdf>