

Validación del método filtración por membrana para análisis microbiológico de coliformes totales y *Escherichia coli* en aguas marinas

Membrane filtration method validation to total coliforms and Escherichia coli microbiological analysis in seawaters

Fecha de recepción: 2015-07-03 / Fecha de aceptación: 2015-10-02

Karen López Suárez

Centro de Investigaciones Oceanográficas e Hidrográficas del Caribe (CIOH). Área de Protección del Medio Marino. Barrio El Bosque, Isla de Manzanillo, Escuela Naval "Almirante Padilla" Cartagena de Indias, Bolívar, Colombia. Tel: +57 (5) 669 41 04. Correo electrónico: klopez@dimar.mil.co.

López Suárez, K. (2015). Validación del método filtración por membrana para análisis microbiológico de coliformes totales y *Escherichia coli* en aguas marinas. Bol. Cient. CIOH 2015, 33: 215-220.

RESUMEN

Se describe la validación del método filtración por membrana, a través de la técnica recuento de colonias utilizando el medio de cultivo agar Chromocult para coliformes totales y *Escherichia coli* en aguas marinas realizada en el laboratorio del Centro de Investigaciones Oceanográficas e Hidrográficas del Caribe, Área de Microbiología. Antes de llevarse a cabo el ensayo de validación se realizaron controles de aseguramiento de la calidad que permitieron garantizar las condiciones de esterilidad de las superficies de trabajo, limpieza y desinfección del laboratorio, equipos, condiciones ambientales de temperatura y humedad, calidad del aire en cada una de las zonas donde se desarrollaron las etapas que involucraron el proceso de validación; así como la preparación y esterilización de los medios de cultivo, material de vidriería y análisis de las muestras. Lo anterior, con la finalidad de facilitar la realización correcta del ensayo y por consiguiente que no se invalidara, afectara, ni comprometiera la calidad y resultados del mismo. Se tomaron cuatro (04) muestras de agua de mar de tipo superficial, con cinco (05) réplicas cada una, procedentes del muelle ubicado en el Centro de Investigaciones Oceanográficas e Hidrográficas del Caribe en Cartagena de Indias. Para llevar a cabo el procesamiento de las muestras se utilizó el método normalizado; es decir, basado en normas, filtración por membrana, contemplado en el Standard Methods. Por tal motivo fue validado para verificar que el contenido y las aportaciones incluidas mantienen el método de ensayo adecuado para el uso previsto. En el proceso de validación se estimaron los valores para los parámetros de repetibilidad y reproducibilidad; así mismo se demostró que el método validado de filtración por membrana en aguas marinas para la determinación de coliformes totales y *E. coli* fue repetible, reproducible y preciso con un 95 % de confianza; por lo tanto el método es adecuado para ser aplicado en el Área de Microbiología del laboratorio del CIOH empleando la matriz agua marina.

PALABRAS CLAVES: validación, filtración por membrana, *E. coli*, agua marina, coliformes.

ABSTRACT

Its describes the membrane filtration method validation through the colony count technique using the culture medium agar Chromocult for Total Coliforms and *Escherichia coli* in seawater conducted in the laboratory of the Caribbean Oceanographic and Hydrographic Research Center, microbiology department. Before carrying out the test validation controls, quality assurance were made to ensure sterile conditions of work surfaces, cleaning and disinfection of laboratory, equipment, environmental temperature and humidity, air quality in each one zones were conducted each one of the stages involving the validation process, as the preparation and sterilization of the culture media, glass material, and analysis of samples. This, in order to facilitate the proper conduct of the trial and therefore that not invalidated, affect or compromise the quality and the results. 4 samples of superficial seawater were taken, with 5 replicates each one, from the harbor located at the Caribbean Oceanographic and Hydrographic Research Center (CIOH) in Cartagena de Indias city. The standard method was used to carry out the processing of samples, that is to say, rule-based, membrane filtration, referred to in Standard Methods. For this reason was validated to verify that the content and contributions included maintaining the test method suitable for the intended use. In the validation process values for the parameters of repeatability and reproducibility were estimated, likewise, it showed that the validated membrane filtration method in seawater for determination of Total Coliforms and *Escherichia coli* was repeatable, reproducible and accurate with 95 % confidence, therefore the method is suitable for application in the area of microbiology laboratory of CIOH using the seawater matrix.

KEYWORDS: validation, membrane filtration, *E. coli*, seawater, coliformes.

INTRODUCCIÓN

El laboratorio del Centro de Investigaciones Oceanográficas e Hidrográficas del Caribe (CIOH) cuenta con áreas las cuales de forma conjunta realizan ensayos fisicoquímicos, biológicos y microbiológicos empleando metodologías basadas en el *Standard Methods* [1], procedimientos técnicos y operativos que el laboratorio tiene implementado dentro de su Sistema de Gestión de Calidad. Lo anterior, constituye una directriz para el adecuado funcionamiento del laboratorio.

Los ensayos que se realizan aplican métodos que satisfacen los requerimientos del cliente [2] y se ajustan a los criterios de aceptabilidad; es decir, son adecuados para la finalidad perseguida y ofrecen resultados confiables. La validación constituye la forma de demostrarlo, porque a través de la evaluación de los parámetros que la integran como precisión, repetibilidad y reproducibilidad, entre otros, se asegura la idoneidad de los métodos.

Es así como validar un método se ha convertido en una herramienta útil e importante para los laboratorios de ensayo y calibración, ya que asegura la confiabilidad en los resultados y satisfacción de los clientes. En ese orden de ideas, el término validación se define como la "Confirmación, a través del examen y el aporte de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto [2].

Las primeras validaciones de métodos reportadas corresponden a las de métodos analíticos químicos, teniendo auge a comienzos de la década de los años 90 y han sido ampliamente abordadas por diferentes organismos reguladores [3]. Estas revisten importancia puesto que corresponden a métodos farmacéuticos, un sector muy sensible por ser vinculación directa a la salud humana [4, 5].

Con relación a los métodos microbiológicos alternativos surgen como una necesidad para obtener respuestas más rápidas de la presencia de un microorganismo determinado en una muestra sometida a análisis; así mismo, con el avance de la ciencia y la tecnología, este tipo de métodos son utilizados ampliamente en el control de la calidad de aguas marinas y/o estuarinas para la detección de microorganismos que refieren su calidad sanitaria.

El método microbiológico utilizado para el proceso de validación en aguas marinas fue el de filtración por membrana. Consistió en pasar un volumen conocido de agua, previamente diluido en 90 ml de agua destilada mediante un filtro estéril de 0.45 μm , aplicando vacío, buscando retener células bacterianas de manera que quedaran homogéneamente distribuidas en el filtro; seguido a lo anterior, se retiró el filtro de la unidad de filtración y se colocó sobre el medio de cultivo, observando la detección simultánea de coliformes totales y *E. Coli* en agar Chromocult, logrando evidenciar que este tipo de medio de cultivo emplea sustratos enzimáticos ampliamente utilizados en el estudio de rutas metabólicas en microorganismos, dado que permiten detectar en diferentes tipos de muestras, la presencia de microorganismos así como enumerarlos e identificarlos. Además, el uso de Chromocult ha sido reportado por diferentes estudios [6-9].

METODOLOGÍA

Para el análisis de coliformes totales y *E. coli* se tuvo en cuenta el procedimiento técnico Determinación y Recuento de Coliformes Totales y *Escherichia Coli*, el cual se encuentra documentado e implementado en el laboratorio del CIOH siguiendo el método filtración por membrana acorde al *Standard Methods* [1].

Las muestras de agua de mar se tomaron directamente del muelle del CIOH a nivel superficial de la columna de agua en frascos *shoot* de 250 ml estériles y el análisis fue realizado en varias etapas.

Filtración de la muestra

Se colocó en el centro de la unidad de filtración el filtro de membrana estéril dejando la cuadrícula hacia arriba con ayuda de una pinza estéril y se ajustó el embudo. Posteriormente, se adicionaron 10 ml de agua de mar y se completó a 100 ml con 90 ml de agua destilada estéril. Se inició la operación del equipo de filtración aplicando vacío con ayuda de una bomba.

Siembra

Una vez filtrada la muestra, se retiró el filtro de membrana y se colocó sobre la superficie del agar *Chromocult*; posteriormente se incubaron las cajas en posición invertida a una temperatura de 35 \pm 0.5°C por un periodo de 24 horas.

Recuento de colonias

Se contaron las colonias color rojo en la placa de agar Chromocult, presuntivas de coliformes totales y azules correspondientes a *E. coli*. Los resultados se dieron en UFC/ml (unidades formadoras de colonias).

Pruebas confirmativas

Se tomaron 2-3 colonias presuntivas de coliformes y fueron aisladas en el agar VRB, donde pasado el tiempo de incubación (35°C por 24 horas) se observó degradación de lactosa y finalmente, para complementar el estudio, se le realizó prueba de oxidasa, la cual consistió en depositar 2-3 colonias aproximadamente en una tirilla, al cabo de 30 segundos se observó la aparición de un color azul marino púrpuro, lo cual indico reacción positiva.

Seguidamente, para la prueba de indol se tomaron 1-2 colonias y se adicionaron a un tubo que contenía caldo triptófano e incubo a 44.5°C por 48 horas; posterior a eso se adicionaron 0.2 ml de reactivo *kovacs* y se observó la presencia de un anillo color rojo cereza en la superficie del caldo, indicando la presencia de indol cuando la prueba es positiva.

En cuanto a la muestras que fueron tomadas, se siguió el procedimiento Operativo MPO-05.03 "Toma de Muestras", implementado por el laboratorio del CIOH y se consideró el Anexo 3 Tabla I (Recomendaciones para el muestreo y preservación de muestras de acuerdo al tipo de análisis) al cual se le dio cumplimiento por ser

muestras que cuentan con una flora microbiana sensible a factores como la temperatura. Por ello el almacenamiento fue a 4°C y transportadas en el menor tiempo posible al laboratorio.

Para el proceso de validación de coliformes totales y *E. Coli* se tomaron cuatro (04) muestras de agua de mar a nivel superficial de la columna de agua, procedentes del muelle CIOH, analizadas con cinco (05) réplicas cada una, realizando el mismo número de lecturas tanto de coliformes totales como *E. Coli*. Las colonias fueron visualizadas de color rojo y azul, respectivamente; las que no cumplieron con estas características no fueron contadas.

Finalmente, los datos de las variables repetibilidad y reproducibilidad fueron obtenidos a través de la aplicación del programa estadístico MINITAB.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos de los recuentos de coliformes totales para cada muestra son reportados en unidades formadoras de colonias y se encuentran relacionados en la Tabla I, donde los valores oscilaron entre 50 y 80 UFC/100ml de manera global, cumpliendo la característica que debe tener una caja de medio de cultivo para ser contada, rango entre 20-80 colonias. Dichos datos se generaron del ensayo de repetibilidad (*r*), parámetro de validación que se define como el grado de concordancia entre los resultados de sucesivas mediciones del mismo mesurando las realizadas en las mismas condiciones de medición (método, material, analista, equipo y laboratorio).

Tabla I. Repetibilidad del método para el recuento de coliformes totales.

Recuento	M1	M2	M3	M4
R1	72	80	69	56
R2	68	78	69	52
R3	71	75	67	50
R4	64	75	70	54
R5	66	77	71	58
Promedio	68.20	77.00	69.20	54.00
Desviación estándar	3.35	2.12	1.48	3.16
Varianza	11.2	4.50	2.20	10.0

Referente a lo contenido en la Tabla II, se observó que de las variables analizadas sólo la m1-m3 no presentaron diferencias significativas, ya que el valor obtenido de la T Calculada para dos muestras cae dentro de la

zona de aceptación de hipótesis, la cual debe estar entre -2.30600 y 2.30600, y el resultado fue -0.610847, existiendo repetibilidad del método filtración por membrana para coliformes totales.

Tabla II. Repetibilidad del método para la determinación de la prueba T.

Variable	F. Calculada	Tipo de Varianza	F. Crítica	T. Calculada	T. Crítica
M1-M2	2.4889	Igual	6.38823	-4.96613	-2.30600
M1-M3	5.09091	Igual	6.38823	-0.610847	-2.30600
M1-M4	0.8928	Igual	6.38823	6.89613	-2.30600
M2-M3	2.04545	Igual	6.38823	6.73817	-2.30600
M2-M4	2.2222	Igual	6.38823	13.5061	-2.30600
M3-M4	4.5454	Igual	6.38823	9.7308	-2.30600

En el caso de *E. coli* en la Tabla III se observan los cinco recuentos por cada muestra analizada,

junto con los promedios, desviación estándar y varianza obtenidos.

Tabla III. Reproducibilidad del método para el recuento de *E. coli*.

Recuento	M1	M2	M3	M4
R1	16	21	21	14
R2	14	24	20	19
R3	13	18	16	14
R4	16	18	23	21
R5	15	20	20	15
Promedio	14.8	20.4	20.0	16.6
Desviación estándar	1.30	2.30	2.55	3.21
Varianza	1.70	5.30	6.50	10.3

Tabla IV. Reproducibilidad del método para la determinación de la Prueba T.

Variable	F. Calculada	Tipo de Varianza	F. Crítica	T. Calculada	T. Crítica
M1-M2	0.320755	Igual	6.38823	-4.73286	-2.30600
M1-M3	0.261538	Igual	6.38823	-4.06052	-2.30600
M1-M4	0.165049	Igual	6.38823	-1.16190	-2.30600
M2-M3	1.22642	Igual	6.38823	0.260378	-2.30600
M2-M4	1.94340	Igual	6.38823	2.15133	-2.30600
M3-M4	1.58462	Igual	6.38823	1.85485	-2.30600

En el resumen estadístico relacionado en la Tabla IV se evidencia que las variables de los ensayos realizados por el mismo analista, equipos, medios de cultivo y con un 95 % de confianza, se estableció que no hay diferencias significativas entre las muestras m1-m4, m2-m3, m2-m4 y m3-m4.

En las tablas V y VI aparecen reportados los resultados del estudio de reproducibilidad (R), otro parámetro involucrado en el ensayo de validación, producto de experiencias realizadas por un analista donde de las cuatro muestras tomadas se escogieron dos al azar para determinar los recuentos de coliformes totales y *E. Coli* en diferentes condiciones de medición.

Tabla V. Resultados del estudio de reproducibilidad para coliformes totales.

Muestras	Día 1	Día 2	F. Calculada	F. Crítica	T. Calculada	T. Crítica
Muestra 1	72	69	2.25	6.38823	1.11187	-2.30600
	68	72				
	71	61				
	64	61				
	66	63				
Muestra 4	56	68	2.18	6.38823	-2.61707	-2.30600
	52	56				
	50	58				
	54	59				
	58	62				

Datos estadísticos	Muestra 1		Muestra 4	
	Día 1	Día 2	Día 1	Día 2
Promedio	68.2	65.2	25.2	60.6
StDev	3.35	5.02	3.16	4.67
Variance	11.2	25.2	10.0	21.8

Tabla VI. Resultados del estudio de reproducibilidad para *E.coli*.

Muestras	Día 1	Día 2	F. Calculada	F. Crítica	T. Calculada	T. Crítica
Muestra 2	21	23	1.56604	6.38823	-0.606339	-2.30600
	24	25				
	19	18				
	18	22				
	20	19				
Muestra 3	21	20	0.692308	6.38823	2.02260	-2.30600
	20	17				
	16	15				
	23	18				
	20	15				

Datos estadísticos	Muestra 2		Muestra 3	
	Día 1	Día 2	Día 1	Día 2
Promedio	20.4	21.4	20.0	17.0
StDev	2.30	2.88	2.55	2.12
Variance	5.30	8.30	6.50	4.50

DISCUSIÓN

A través de la validación del método filtración por membrana en el laboratorio se determinaron parámetros de repetibilidad donde las variables analizadas para el indicador bacteriológico coliformes totales demostraron diferencias significativas, ya que el valor hallado de la T calculada cae dentro de la zona de aceptación de hipótesis, la cual con base en la Tabla II debe estar entre -2.30600 y 2.30600 y el resultado fue de -0.610847, existiendo repetibilidad, mientras que con el resto de variables analizadas m1-m2, m1-m4, m2-m3, m2-m4 y m3-m4, existen diferencias significativas debido a que la prueba T calculada cae en la zona de rechazo de hipótesis.

Este resultado posiblemente se debió a que este grupo de bacterias se encontró en gran cantidad en la matriz que fue objeto de estudio por ser indicadores de contaminación y por ende, la población de coliformes contenida en el volumen conocido de agua (10 ml) se concentró demasiado al ser retenida en la membrana filtrante, variando el tamaño de las colonias, lo cual dificulta el desarrollo de todos los microorganismos que se van a contar y que las colonias obtenidas no mostraran plenamente la morfología deseada. Por lo anterior se evidencia la variabilidad estadística de los recuentos.

En cuanto a *E. coli*, el grupo de las seis variables analizadas, cuatro fueron repetibles, es decir, que el método de filtración por membrana para la matriz agua marina es repetible; por lo tanto se establece que no hay diferencias significativas estadísticamente, con un 95 % de confianza.

La reproducibilidad del método evaluado para *E. coli* fue reproducible bajo un 95 % de confianza y pruebas con varianzas iguales, considerando diferentes días de lecturas entre las muestras naturales 2 y 3 (Tabla VI), las que fueron seleccionadas de forma aleatoria, demostrando que ambas muestras no presentaron diferencias significativas y el valor arrojado en la prueba T se encontró dentro de la región de aceptación de la hipótesis.

CONCLUSIONES

Durante el desarrollo del proceso de validación de coliformes totales y *E. coli*, el método normalizado filtración por membrana en agar Chromocult fue aplicable para el análisis del analito y en la matriz que fue objeto de estudio en el parámetro precisión, en términos de repetibilidad y reproducibilidad.

De igual manera, la validación del método arrojó resultados confiables debido a cada uno de los controles de aseguramiento de la calidad que fueron realizados; además demostró ser apto para ser empleado en el laboratorio del CIOH, Área de Microbiología.

LITERATURA CITADA

- [1] AAPHA-AEEA-WEF. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21st Edition. 2005, pp. 9-66 9222D.
- [2] Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración ISO/IEC 17025:2005.
- [3] United States Pharmacopeial Convention USP XXII, NF XVII - Inc. Rockville United States Pharmacopeia Convention; 1990.
- [4] Food and Drug Administration. Guideline for Submitting Samples and Analytical Data for Method Validation. US Government Printing Office; 1990.
- [5] Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Comparability Protocols –Chemistry, Manufacturing, and Controls Information. Draft Guidance 2003. Disponible en: URL: <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>
- [6] Calpena, A.C., Escribano, E. y Fernández, C. Validación de los métodos analíticos. Farm Clin 1991; 7(9):749-58.
- [7] Maheux, A., Huppe, V., Boissinot, M., Picard, F., Bissonnette, L., Bernier, J. y Bergeron, M. Analytical limits of four B-glucuronidase and B-galactosidase-based commercial culture methods used to detect *Escherichia coli* and total coliforms journal of Microbiological Methods 2008, 75: 506-514.
- [8] Schets F.M., Nobel, S. P.J., Strating, K.A., Mooijman, G.B., Engels y Brouwer A. EU Drinking Water Directive reference methods for enumeration of total coliforms and *Escherichia Coli* compared with alternative methods letters in Applied Microbiology 2001, 34: 227-231.
- [9] Geissler, K., Manafi, M., Amoro, S.I. y Alonso, J.L. Quantitative determination of total coliforms and *Escherichia Coli* in marine waters with chromogenic and fluorogenic media journal of Applied Microbiology 2000, 88: 280-285.