



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA DE INGENIERÍA CIVIL
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA AMBIENTAL



**ELABORACIÓN DE UN MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA LA
TOMA DE MUESTRA, ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS
PARÁMETROS MICROBIOLÓGICOS MÁS RELEVANTES EXISTENTES
EN EL AGUA PARA CONSUMO HUMANO, APLICABLE EN EL
LABORATORIO DE CALIDAD AMBIENTAL DE LA FACULTAD DE
INGENIERÍA DE LA UNIVERSIDAD DE CARABOBO**

Elaborado por:

Herrera, Dorimar

Pedroza, Juset

Tutor:

Ing. Rafael Dautant

Bárbula, noviembre de 2016



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA DE INGENIERÍA CIVIL
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA AMBIENTAL



**ELABORACIÓN DE UN MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA LA
TOMA DE MUESTRA, ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS
PARÁMETROS MICROBIOLÓGICOS MÁS RELEVANTES EXISTENTES
EN EL AGUA PARA CONSUMO HUMANO, APLICABLE EN EL
LABORATORIO DE CALIDAD AMBIENTAL DE LA FACULTAD DE
INGENIERÍA DE LA UNIVERSIDAD DE CARABOBO**

**TRABAJO ESPECIAL DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARA
OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO CIVIL**

Elaborado por:
Herrera, Dorimar
Pedroza, Juset

Bárbula, noviembre de 2016



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA DE INGENIERÍA CIVIL
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA AMBIENTAL



**ELABORACIÓN DE UN MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA LA
TOMA DE MUESTRA, ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS
PARÁMETROS MICROBIOLÓGICOS MÁS RELEVANTES EXISTENTES
EN EL AGUA PARA CONSUMO HUMANO, APLICABLE EN EL
LABORATORIO DE CALIDAD AMBIENTAL DE LA FACULTAD DE
INGENIERÍA DE LA UNIVERSIDAD DE CARABOBO**

Elaborado por: Herrera, Dorimar
Pedroza, Juset

Tutor: Ing. Rafael Dautant

Fecha: Noviembre de 2016

RESUMEN

La finalidad del presente proyecto fue elaborar un manual de procedimientos para la toma de muestra, análisis e interpretación de parámetros microbiológicos más relevantes existentes en el agua para consumo humano, el cual se utilizará en el Laboratorio de Calidad Ambiental de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Carabobo. Establecido como un tipo de investigación descriptiva y un diseño mixto, en donde se tiene una modalidad de proyecto factible. Cabe destacar que se realizó un diagnóstico para determinar la necesidad de un manual de prácticas microbiológicas al agua, mediante la recopilación de información a través del pensum de la carrera, el contenido programático de la materia Biología y Microbiología Sanitaria y la entrevista, ésta última tenía una forma estructura dirigida a un profesional en el tema, además se aplicó la matriz FODA y la de estrategias, para tener una perspectiva clara de la situación y las estrategias que influyen en la solución. Consecutivamente, se realizó un estudio de factibilidad técnica donde se estableció la disponibilidad de los recursos necesarios para la realización del manual y se creó una lista de materiales necesarios para la ejecución de las prácticas. Por último se diseñó la propuesta, la cual fue un manual de procedimientos de las prácticas microbiológicas al agua. Entre los resultados más relevantes destacan, la necesidad de un manual de estudios microbiológicos al agua y la determinación de la factibilidad técnica para el diseño del manual. Finalmente la elaboración del manual contó de tres (3) prácticas, y una sección introductoria al tema, donde el estudiante conocerá el propósito, y de manera visual se fomentara el aprendizaje del tema tratado, además una sección de interés acerca de la toma de muestras.

Palabras claves: agentes microbiológicos, calidad del agua, contaminación, prácticas de laboratorio.

DEDICATORIA

Cuando, en un momento de frustración y tristeza, pensé en abandonarlo todo y no seguir adelante con mi carrera, Tú me mostraste el camino; hiciste que creyera de nuevo en mí, en mis sueños y lograste que aumentara mi Fe en ti. Por eso mi DIOS te dedico esta última evaluación de mi carrera, porque tú has sido mi fiel compañero desde el primer momento en que decidí estudiar Ingeniería Civil.

También le dedico este trabajo a mis padres, que han sido mi motor para llegar hasta aquí, pieza fundamental en este logro personal tan importante. Siempre estuvieron ahí, apoyándome y regalándome las palabras justas y los abrazos más reconfortantes. Jamás dejaron de creer en mí. Este logro es de ustedes. LOS AMO CON TODA MI ALMA.

A mis abuelos, mis tíos, mis hermanos y toda mi familia porque son mi mayor bendición. En especial mi abuelo José Baudilio que desde el cielo celebra conmigo, TE AMO TANTO MI VIEJITO.

A todos y cada uno de los profesores de la Facultad de Ingeniería que fueron parte de mi formación como profesional, su esfuerzo no fue, no es ni será en vano.

A mi hermosa Escuela de Ingeniería Civil... Te llevaré en mi corazón por siempre.

Dorimar Karina Herrera Tovar

AGRADECIMIENTOS

Primeramente a DIOS por bendecirme y acompañarme en este camino; por darme salud para lograr esta meta, por llenarme de sabiduría, paciencia y perseverancia ante cada dificultad que se me presentó y por mostrarme la grandeza de su palabra, de su espíritu y de su amor. ¡GRACIAS MI DIOS!

A mis padres, José Dóris y María Teresa, quienes nunca dudaron que llegaría hasta aquí. Gracias por su apoyo y por su amor incondicional, gracias por el esfuerzo que ambos hicieron durante todos estos años para mantenerme aquí. Gracias por esos días de visitas fugaces, horas de mucha felicidad. Definitivamente tenerlos es una GRAN BENDICION. Gracias a ustedes soy lo que soy y estoy donde estoy. Este logro, más que mío es de ustedes.

Gracias a mis abuelos, hermanos y demás familiares, que de alguna u otra forma fueron parte de éste recorrido, con palabras de apoyo y motivación.

Gracias a ti mi Nene, por apoyarme y asegurarte de que siempre estuviera bien. Gracias por tu amor, tu cariño y tus consejos, eres maravilloso. Te admiro mucho y juntos lograremos cada una de nuestras metas propuestas. ¡TE AMO!

Gracias a todos mis amigos, que son la familia que yo escogí. En especial a mi compañera Juset; gracias por tenerme paciencia y por tu amistad sincera y maravillosa. Son los mejores, Dios los bendiga. Los quiero mucho.

Finalmente, gracias a los profesores de mi querida Facultad de Ingeniería; cada uno de ellos colocó un granito de conocimiento en mi formación como ingeniera, pero especialmente a la profesora Maryelvi, gracias por su colaboración y dedicación.

Dorimar Karina Herrera Tovar

DEDICATORIA

Primeramente le quiero dedicar mi tesis a Dios, sin su ayuda y paciencia, no estuviera aquí, literalmente. A mi madre María Conde que supo darme un buen ejemplo de ser una mujer luchadora y con principios, a mi hermano Miguel Pedroza, tienes un bello corazón , te amó hermano , a mi tía Valeria Conde que es una persona súper especial en mi vida, a mi prima Mayra Alejandra Londoño una persona íntegra de buen corazón y con mucha generosidad, a mi primo Darwin Conde quien es como un segundo hermano y a pesar de que muchas veces me quedaba dormida de tanto que me hablaba, él siempre estuvo ahí para escucharme, a mi tío HERNAN LONDOÑO MADRID de quien puedo hablar horas y horas por lo extraordinario que era, su bondad, su cariño y el hecho de que a pesar de no llevar mi sangre me trato mejor que a una sobrina, de verdad lo extraño mucho pero sé que lo volveré a ver. Siempre recordare cuando entre risas me preguntaba si no podía ser una niña normal.

A todos gracias, este logro es para ustedes también. ¡LOS AMO!

Juset Anyerbelys Pedroza Conde

AGRADECIMIENTOS

Hoy te quiero agradecer Jesucristo por enseñarme a ser más como tú y menos como yo, quiero agradecerte por decirme cuando actúo mal y cuando actúo bien, por amarme como me amas, pues, tu amor me impulsa a seguir luchando y por ti llegué a donde estoy, eso siempre lo tendré presente y no mencionarte en este logro sería como negarme a mí misma, sabes lo que necesito y siempre lo suples de alguna u otra manera, tu inspiras a cualquiera a soñar porque contigo todo es posible, si me pusiera a contar todas las veces que me has echado la mano en mis estudios los agradecimientos no serían de una página sino de muchas y me quedaría corta, contigo las cosas simplemente son perfectas. Una de las cosas que quiero resaltar, es que pusiste en mi vida a las siguientes personas:

Principalmente a mi familia que a pesar de sus fallas son un ejemplo ya que siempre han sido guerreros para salir adelante (en especial a mi tío bello y hermoso que hora está en tus brazos), a Jheffer Maldonado que me apoyo en los momentos más difíciles sin importar nada, a la Sra. Beatriz Arias que me dijo un día “las cosas se tienen que hacer bien y no hacer por hacer”, a Tomas Loaiza que me sigue apoyando desde lejos y alentando (es un gran amigo), a todos los muchachos de la universidad que formamos el grupo de los que resuelven a última hora (jejeje), a mi compañera de tesis (Dorimar Herrera) que aparte de ser una excelente persona, es una gran amiga, a Daira Mercado, Brusneylys Hernández y Maritza Romero unas grandes amigas, y por último Rosario Torres, Mariela Lucena grandes personas. De verdad gracias por cada una de estas personas ya que cada una ha sido una bendición en mi vida y ninguna vale más que otra pues el afecto es distinto y lo que tiene de distinto es lo que hace a cada uno de ellos especiales. Solo te pido bendícelos a ellos como me bendijiste a mí al ponerlos en mi vida, pues cada uno forma una pequeña parte de este logro, y siempre los tendré presente hasta un nuevo amanecer.

Juset Anyerbelys Pedroza Conde

ÍNDICE

RESUMEN.....	v
DEDICATORIA	vii
AGRADECIMIENTOS	viii
DEDICATORIA	ix
AGRADECIMIENTOS	x
ÍNDICE	xi
ÍNDICE DE TABLAS	xv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xv
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I.....	5
EL PROBLEMA	5
Planteamiento del problema.....	5
Formulación del problema	8
Objetivos de la investigación	9
Objetivo General	9
Objetivos Específicos.....	9
Justificación de la investigación	10
Alcance y limitaciones	11
Alcance.....	11
Limitaciones	11
CAPÍTULO II	13
MARCO TEÓRICO REFERENCIAL.....	13
Antecedentes de la Investigación	13
Bases teóricas	15
Teóricas de Aprendizaje.....	15
Análisis microbiológicos.....	15
Toma de muestra	16
Recepción de las muestras	16

Identificación de la muestra	17
Transporte de la muestra y conservación en el laboratorio.....	17
Medio de cultivo	18
Prueba presuntiva.....	19
Prueba confirmativa	19
Caldo Lauril Sulfato.....	20
Caldo Bilis Verde Brillante 2%.....	21
Mac Conkey Agar	21
Cetrimide Agar.....	22
Definición de términos básicos	22
Marco Normativo Legal.....	26
CAPÍTULO III.....	29
MARCO METODOLÓGICO.....	29
Tipo de investigación	29
Diseño de la investigación	30
Población y muestra	30
Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	31
Validez del instrumento	31
Descripción de la metodología.....	32
Fase I: Diagnóstico de la necesidad de diseñar un manual para la toma de muestra, análisis e interpretación de los parámetros microbiológicos existentes en el agua para consumo humano, el cual se utilizará en el laboratorio de Calidad Ambiental de la Facultad de Ingeniería Civil.	32
Fase II: Determinación de la factibilidad técnica para un manual de procedimientos para la toma de muestra, análisis e interpretación de parámetros microbiológicos existentes en el agua para consumo humano, el cual se utilizará en el Laboratorio de Calidad Ambiental de la Facultad de Ingeniería Civil.....	33
Fase III: Diseño de un manual de procedimientos para la toma de muestra, análisis e interpretación de parámetros microbiológicos existentes en el agua	

para consumo humano, el cual se utilizará en el laboratorio de Calidad Ambiental de la Facultad de Ingeniería Civil.	35
Análisis de datos	35
CAPÍTULO IV	37
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	37
Fase I: Diagnóstico de la necesidad de diseñar un manual para la toma de muestra, análisis e interpretación de los parámetros microbiológicos existentes en el agua para consumo humano, el cual se utilizará en el laboratorio de Calidad Ambiental de la Facultad de Ingeniería Civil.	37
FASE II: Determinación de la factibilidad técnica para un manual de procedimientos para la toma de muestra, análisis e interpretación de parámetros microbiológicos existentes en el agua para consumo humano, el cual se utilizará en el Laboratorio de Calidad Ambiental de la Facultad de Ingeniería Civil.	41
FASE III: Diseño de un manual de procedimientos para la toma de muestra, análisis e interpretación de parámetros microbiológicos existentes en el agua para consumo humano, el cual se utilizará en el Laboratorio de Calidad Ambiental de la Facultad de Ingeniería Civil.	49
CAPÍTULO V	53
LA PROPUESTA	53
ÍNDICE	55
INTRODUCCIÓN	57
MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA	59
Tipos de muestras.....	59
Modalidad de captación	61
Control de la muestra	62
Preparación de envases para la toma de muestras.....	62
Identificación de las muestras	63
Almacenamiento de la muestra	63
PRÁCTICA 0	64
INTRODUCCIÓN AL LABORATORIO	64

PRÁCTICA 1	72
COLIFORMES TOTALES.....	72
PRÁCTICA 2	83
COLIFORME FECALES	83
PRÁCTICA 3	89
PSEUDOMONAS AERUGINOSA.....	89
ANEXO A.....	97
CONCLUSIONES	101
RECOMENDACIONES	103
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105
ANEXO A.....	109
ANEXO B.....	111
ANEXO C	113
ANEXO D.....	115

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Matriz FODA</i>	39
Tabla 2. <i>Matriz de estrategias</i>	40
Tabla 3. <i>Cronograma de Actividades</i>	41
Tabla 4. <i>Análisis de Costos</i>	44
Tabla 5. <i>Lista de equipos, materiales y reactivos, para la realización de prácticas microbiológicas</i>	45
Tabla 6. <i>Análisis de costos de reactivos, instrumentos y equipos no disponibles en el laboratorio</i>	46
Tabla 7. <i>Composición Caldo Lauril Sulfato</i>	46
Tabla 8. <i>Composición Caldo Bilis Verde Brillante 2%</i>	47
Tabla 9. <i>Composición Mac Conkey Agar</i>	47
Tabla 10. <i>Composición Cetrimide Agar Base</i>	47
Tabla 11. <i>NMP y límite de confianza del 95% entre los cuales puede variar para las diversas combinaciones de resultados positivos, obtenido de tres porciones (10, 1, 0,1)</i>	76
Tabla 12. <i>Índices de NMP y límites de confianza de 95% para varias combinaciones de resultados positivos y negativos</i>	95

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Toma de muestra.	16
Figura 2. Envases para recepción de muestras.....	17
Figura 3. Identificación de la muestra.....	17
Figura 4. Transporte de la muestra.....	18
Figura 5. Conservación de la muestra.....	18
Figura 6. Medio de cultivo.....	18
Figura 7. Prueba presuntiva para Coliformes.....	19

Figura 8. Prueba confirmativa para coliformes totales.	20
Figura 9. Prueba confirmativa para coliformes fecales.....	20
Figura 10. Caldo Lauril Sulfato.	21
Figura 11. Caldo Bilis Verde Brillante 2%.	21
Figura 12. Mac Conkey Agar.....	22
Figura 13. Cetrimide Agar.	22
Figura 14. Aspectos considerados en el estudio de factibilidad.....	34
Figura 15. Flujograma del Proceso Global de Transformación.	43
Figura 16. Macrolocalización.....	48
Figura 17. Microlocalización.	48
Figura 18. Bacilo Gram-negativo.....	73
Figura 19. Prueba presuntiva positiva.	75
Figura 20. Prueba confirmativa.....	75
Figura 21. Escherichia de color rojo.	84
Figura 22. Citrobacter y Arizona de color rosa o rojo con centro negro.	84
Figura 23. Muestras con ausencia y presencia de Coliformes fecales.	87
Figura 24. Pseudomonas aeruginosa.	90
Figura 25. Medio de cultivo en tubos de ensayo.....	93
Figura 26. Prueba confirmativa de Pseudomonas Aeruginosa	95

INTRODUCCIÓN

La calidad del agua es un tema de importancia a nivel mundial, ya que, la salubridad de este vital líquido es esencial para la conservación de ecosistemas, el crecimiento de la economía y el buen funcionamiento de las comunidades de cualquier país.

La contaminación del agua se ha agravado con el pasar de los años, resultando así un impacto en el medio ambiente y en la salud de la población que la consume. Las características del agua se pueden determinar mediante los análisis físicos, químicos y microbiológicos, los cuales son realizados en los laboratorios especializados.

Cabe destacar que, para conocer con certeza la calidad del agua para consumo humano, se deben determinar todas las características mencionadas, como se establece en las Normas Sanitarias de Calidad del Agua potable (Gaceta Oficial 36.395). Por otra parte, el ingeniero civil se encarga del diseño de redes de agua, de desagüe, de conexión domiciliaria, así como también de tanques elevados, plantas de tratamiento, entre otras, con el objeto de satisfacer las necesidades básicas de la población. Dentro de éste marco, la Ingeniería Civil juega un papel importante evaluando, previniendo, minimizando y/o mitigando los impactos ambientales que las obras producen.

En este sentido, es importante que el ingeniero civil conozca los procedimientos para la realización de estos análisis, lo que permitirá una interpretación apropiada de sus resultados. En el caso de los ensayos microbiológicos, se puede prevenir la propagación de enfermedades transmitidas por ciertos tipos de bacterias como los coliformes y las pseudomonas.

El laboratorio, en entes educacionales, es considerado un espacio para la investigación formativa en el cual se llevan a cabo diversas actividades académicas que favorecen el proceso de enseñanza-aprendizaje de alumnos y profesores. En el momento en que un estudiante culmina su formación profesional a nivel de pre-grado se enfrenta a un campo laboral en el que además de necesitar del conocimiento teórico de la carrera, impartido en cada una de las cátedras que conforman el pensum de la carrera, se hace necesaria la experiencia práctica; ésta es adquirida en cada uno de los laboratorios que complementan el contenido programático de las respectivas cátedras.

Ahora bien, en el Laboratorio de Calidad Ambiental de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Carabobo actualmente se realizan los estudios fisicoquímicos como parte de la formación profesional de los futuros ingenieros pero, en atención a lo explicado anteriormente, también es necesario el conocimiento sobre los estudios microbiológicos. El propósito de esta investigación consistió en la elaboración de un manual de procedimientos para la toma de muestra, análisis e interpretación de parámetros microbiológicos existentes en el agua para consumo humano, el cual se aplicará en el laboratorio mencionado.

La investigación consta de cinco (5) capítulos, los cuales se describen a continuación:

En el capítulo I, se describe el problema de la investigación, sus objetivos (generales y específicos), la justificación, alcance y limitaciones de la misma. En el capítulo II, se presentan los antecedentes que sirvieron de base para la investigación y los fundamentos teóricos y legales que facilitan su comprensión. En el capítulo III se expone la metodología a utilizar y el desarrollo de los objetivos.

Seguidamente, en el capítulo IV se presenta el análisis de los resultados obtenidos mediante las herramientas utilizadas. Finalmente el capítulo V, la presentación del

manual. De la información presentada en estos dos capítulos, se derivaron las conclusiones y recomendaciones de la investigación.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del problema

La Organización de las Naciones Unidas (ONU) en celebración del día mundial del agua el 22 de marzo anunció lo siguiente:

“El agua es un elemento esencial del desarrollo sostenible. Los recursos hídricos, y la gama de servicios que prestan, juegan un papel clave en la reducción de la pobreza, el crecimiento económico y la sostenibilidad ambiental. El agua propicia el bienestar de la población y el crecimiento inclusivo, y tiene un impacto positivo en la vida de miles de millones de personas, al incidir en cuestiones que afectan a la seguridad alimentaria y energética, la salud humana y al medio ambiente.” (ONU, 2016)

“El agua dulce limpia, segura y de calidad es esencial para la supervivencia de todos los organismos vivos y el funcionamiento de los ecosistemas, las comunidades y las economías.” (ONU, 2016)

Entre los objetivos de la ingeniería ambiental se encuentra la provisión de abastecimiento de agua seguro, y una disposición y control adecuado de los vertidos líquidos. Para estudiar las diferentes características del agua, se han desarrollado métodos y procedimientos de campo y laboratorio. La calidad del agua potable es un tema que preocupa en países de todo el mundo, en desarrollo y desarrollados, por su repercusión en la salud de la población. El agua es considerada insana cuando posee

desechos de animales u otros contaminantes y antes de ser considerada apta para consumo humano se le deben realizar estudios físicos, químicos y microbiológicos que engloban métodos analíticos basados en los Métodos Estándar para el Examen del Agua y Aguas Residuales publicado por la Asociación Americana de Salud Pública, desarrollados con la finalidad de obtener resultados confiables y representativos.

Tanto en Venezuela como en otros países, los análisis microbiológicos se realizan en laboratorios especializados para ello, rigiéndose por lo establecido en el Métodos Estándar y en la normativa vigente correspondiente en cada país. Estos estudios se hacen tanto en laboratorios privados y públicos donde el personal encargado se guía por un manual que contiene los procedimientos a seguir; así como también en universidades, siempre y cuando se cuente con los recursos e información necesaria, con el propósito de contribuir con la comunidad estudiantil en su preparación como profesionales.

La Escuela de Ingeniería Civil de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Carabobo, para la formación de profesionales que cumplan con los requerimientos actuales del país, y del proceso de globalización, cuenta con tres departamentos: estructuras, vialidad e ingeniería ambiental, donde el último pretende, además de crear una conciencia de los impactos sobre el ecosistema de las actividades del ingeniero, minimizarlos, y resolver problemas de planificación urbanística y de abastecimientos públicos de agua potable. López Darwin (2016)

Actualmente, los estudiantes de ingeniería civil cuentan con la asignatura biología y microbiología sanitaria dentro de las cátedras de este departamento, anexada como asignatura electiva al pensum de la carrera, donde el objetivo principal de la misma es que los estudiantes cuenten con los conocimientos necesarios para solucionar problemas microbiológicos y sanitarios, y aplicar estos conocimientos con bastante eficiencia al momento de ejercer como profesional. Se debe mencionar que la materia

no abarca información referente a los ensayos microbiológicos del agua, tema fundamental en la formación de todo ingeniero civil.

A su vez, el Departamento de Ingeniería Ambiental cuenta con la asignatura Laboratorio de Calidad Ambiental donde, hoy por hoy, se realizan únicamente estudios fisicoquímicos al agua como parte del contenido programático de la materia. Se desea que en un futuro se puedan realizar los análisis microbiológicos al agua, como parte del programa de la asignatura, considerados como complemento a los que se realizan actualmente; y así contribuir con la formación de profesionales capacitados en el tema. Teniendo en cuenta la importancia de estos estudios y con la disposición del laboratorio, los estudiantes podrían hacer uso del mismo para realizar estas prácticas, donde podrán comprender los métodos experimentales a aplicar, así como también aprender la manera correcta de cómo tomar una muestra y analizar e interpretar correctamente datos y resultados obtenidos.

Debido a lo antes mencionado y a la importancia de estos estudios en la formación de los estudiantes de ingeniería civil de la Facultad de Ingeniería, surge la necesidad de elaborar un manual de procedimientos para la toma de muestra, análisis e interpretación de los parámetros microbiológicos más relevantes existentes en el agua para consumo humano, basado en el Métodos Estándar para el Examen del Agua y Aguas Residuales y en las Normas Venezolanas COVENIN correspondientes; en el cual se mostrará de forma detallada los procedimientos y la descripción de los análisis que deben realizarse en las prácticas, el mismo es una traducción de los métodos estandarizados para la examinación del agua que actualmente existen, además el manual que se propone también contará con una breve introducción de cada practica para la fácil comprensión de las mismas.

De este modo, la excelencia académica puede ser cultivada y crecer mediante la capacitación y formación de profesionales que cumplan con los requerimientos actuales del país. (López, 2016)

Formulación del problema

Dadas las consideraciones previas, es preciso elaborar las siguientes interrogantes:

1. ¿Cómo diagnosticar la necesidad de un manual para realizar estudios microbiológicos al agua en el Laboratorio de Calidad Ambiental de la Facultad de Ingeniería?
2. ¿De qué forma se puede determinar la disponibilidad de los recursos necesarios para realizar las prácticas de estudios microbiológicos al agua en el Laboratorio de Calidad Ambiental?
3. ¿Cómo debe ser la estructuración del manual que se propone para facilitar la realización y entendimiento de las prácticas en el laboratorio?

Objetivos de la investigación

Objetivo General

Elaborar un manual de procedimientos para la toma de muestra, análisis e interpretación de los parámetros microbiológicos existentes en el agua para consumo humano, el cual se utilizará en el laboratorio de Calidad Ambiental de la Facultad de Ingeniería Civil.

Objetivos Específicos

1. Diagnosticar la necesidad de diseñar un manual de procedimientos para la toma de muestra, análisis e interpretación de los parámetros microbiológicos existentes en el agua para consumo humano, el cual se utilizará en el laboratorio de Calidad Ambiental de la Facultad de Ingeniería Civil.
2. Determinar la factibilidad técnica para el diseño de un manual de procedimientos para la toma de muestra, análisis e interpretación de parámetros microbiológicos existentes en el agua para consumo humano, el cual se utilizará en el laboratorio de Calidad Ambiental de la Facultad de Ingeniería Civil.
3. Diseñar un manual de procedimientos para la toma de muestra, análisis e interpretación de parámetros microbiológicos existentes en el agua para consumo humano, el cual se utilizará en el laboratorio de Calidad Ambiental de la Facultad de Ingeniería Civil.

Justificación de la investigación

El agua es un recurso natural de vital importancia para todos los sectores socioeconómicos, ya que el desarrollo humano y económico es sencillamente imposible si no existiese un abastecimiento de agua seguro y estable. El estudio del agua está dividido en físico-químico y microbiológico, y los resultados de estos estudios es lo que indicará si el agua es o no apta para ser consumida.

Debido a la importancia de los estudios microbiológicos del agua en la formación de un ingeniero civil, es necesario fortalecer los conocimientos sobre este tema en los estudiantes de ingeniería civil de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Carabobo, en vista de que en la asignatura Laboratorio de Calidad Ambiental solo abarcan los estudios físicos y químicos del agua como parte de la formación académica de los futuros profesionales. Con la finalidad de abastecer esta necesidad de conocimiento sobre la microbiología del agua, se espera poder realizar, en un futuro, las prácticas de estudios microbiológicos en el laboratorio mencionado; y además se podrían efectuar estos análisis a entes externos con la finalidad de generar recursos para la conservación del mismo, como se realiza actualmente en el Laboratorio de Calidad Ambiental de la Universidad Metropolitana y de la Universidad Centrooccidental Lisandro Alvarado.

Partiendo de lo antes mencionado, surge la necesidad de diseñar un manual de procedimientos para la toma de muestra, análisis e interpretación de parámetros microbiológicos, en el cual se mostrará de forma detallada la información, los procedimientos y la descripción de los análisis que deben realizarse en cada práctica, lo que, desde el punto de vista técnico, facilita la comprensión del uso de los análisis microbiológicos en la determinación de los microorganismos más contaminantes del agua, lo cual se puede relacionar con otras asignaturas del mismo departamento, como higiene y saneamiento ambiental y biología y microbiología sanitaria.

En este sentido, esta investigación es un beneficio para los estudiantes, logrando ampliar sus conocimientos respecto a la importancia del estudio microbiológico del agua. Cabe destacar que esta investigación también puede servir de referencia en la realización de futuras investigaciones.

Alcance y limitaciones

Alcance

Se diseñó un manual de procedimientos para la toma de muestras de los parámetros microbiológicos coliforme total, coliforme fecal y pseudomonas aeruginosa, bajo la asesoría de la empresa Diseños Ambientales C.A. (DISA, C.A.), el cual se desea implementar a futuro en el Laboratorio de Calidad Ambiental de la Escuela Ingeniería Civil.

Limitaciones

En el manual desarrollado se tomaron en cuenta únicamente los siguientes parámetros microbiológicos: coliformes totales, coliformes fecales y pseudomonas aeruginosa; en el mismo sólo se indican los procedimientos a seguir para la determinación de cada parámetro. No hay información recolectada sobre el tratamiento que se le debe aplicar al agua en presencia de alguno de estos organismos. Está diseñado para ser aplicado en el Laboratorio de calidad Ambiental de la Facultad de Ingeniería.

Se debe acotar que no está prevista la implementación del manual, dejando esto a decisión de la cátedra Laboratorio de Calidad Ambiental del Departamento de Ingeniería Ambiental de la Escuela de Ingeniería Civil.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

Para el desarrollo del presente capítulo se consultaron textos, publicaciones y trabajos de investigación que permitieron determinar los antecedentes para la propuesta que se abordó en este estudio, las bases teóricas para el conocimiento y manejo de los términos adecuados y el marco legal, que establece la debida normativa para la creación del manual que se propone; permitiéndonos de esta manera, fijar los lineamientos de acción necesarios para la consecución de esta investigación.

Antecedentes de la Investigación

López, D (2016), en su trabajo de ascenso como profesor asistente en la Universidad de Carabobo propone la **elaboración de una propuesta para la enseñanza en el Laboratorio de Calidad Ambiental de la Escuela de Ingeniería Civil, Facultad de Ingeniería, Universidad de Carabobo** basándose en un diseño de investigación no experimental de campo y un tipo de investigación descriptiva, enmarcándola en la modalidad de proyecto factible. En este sentido, se hizo un diagnóstico del sistema de enseñanza – aprendizaje, se determinó mediante un estudio de factibilidad técnica la disponibilidad de equipos, materiales e instrumentos necesarios para la ejecución del proyecto, lográndose una actualización del manual usado en las prácticas de laboratorio. El aporte principal a la presente investigación, será la estructuración y la metodología empleada para el desarrollo de la propuesta.

DISA C.A (2015), elaboró el **Manual de Bacteriología. Análisis de aguas y aguas de desecho**, donde realizó una recopilación documental de algunos ensayos incluidos dentro de los métodos normalizados para el análisis de agua y agua residual, además en él se presenta la manera correcta de recolección de muestras, almacenamiento de cultivos y los principales indicadores de contaminación, así como también los materiales e instrumentos a usar en el laboratorio. En el presente trabajo se usarán los métodos presentados en este manual, adaptándolos al campo de la enseñanza, y a los estandarizados.

Flores, D (2012), explica en su investigación **Manual de Actividades Prácticas a Microescala para los Laboratorios de Química de Tercer Año para el Mejoramiento de la Calidad Ambiental en los Liceos del Municipio Guanare**, que las técnicas de laboratorio de química a microescala, promueven entre los estudiantes el desarrollo de habilidades y destrezas, toda vez que el manejo de pequeñas cantidades de sustancias o la manipulación de equipos de trabajo de tamaños reducidos o diferentes a los convencionales requiere de un alto grado de pericia, lográndose la formación de habilidades, actitudes y valores al generar una cultura de cuidado del medio ambiente. Esta investigación está enmarcada en un tipo de investigación descriptiva, vinculada a la modalidad de proyecto factible, apoyado en una investigación documental y de campo. En este sentido, fue de utilidad para la presente investigación, donde se desarrolló un manual que permita además de enseñar procedimientos, establecer su utilidad desde el punto de vista ambiental.

Sanabria, J y Acevedo, D (2001), en la investigación **Curso de Microbiología Ambiental para: Estudiantes de Ingeniería Sanitaria y Ambiental** plantean un curso para capacitarse en el manejo del laboratorio y en algunas pruebas específicas, con el objetivo de que el estudiante esté en capacidad de reconocer los diferentes instrumentos y materiales usados en el laboratorio de microbiología, así como también conocer las normas de trabajo del mismo y las técnicas de esterilización de los materiales, obteniendo un buen desempeño del estudiante durante las prácticas

que se proponen en el curso. La investigación está enmarcada en un tipo de investigación descriptiva, apoyada en un diseño de investigación no experimental de campo. La estructuración del trabajo antes mencionado sirve como guía a la investigación que se está realizando, ya que le facilita al estudiante la comprensión, entendimiento e importancia de los estudios microbiológicos.

Bases teóricas

A continuación se desarrollarán algunos conceptos que permitirán la comprensión de la problemática a resolver en la presente investigación:

Teóricas de Aprendizaje

En el presente estudio el constructivismo es el eje fundamental de la misma, específicamente las teorías de aprendizaje por descubrimiento de Bruner (1978) y el aprendizaje significativo de Ausubel (1987) debido a que se enfocan y relacionan más con las actividades realizadas en el laboratorio, estas teorías permitirán al docente ayudar a los estudiantes a captar la estructura de un campo de estudio. Este tipo de aprendizaje pretende lograr la motivación intrínseca, el conflicto intelectual y la curiosidad. El estudiante aprende significativamente cuando es capaz de relacionar las nuevas ideas con algún aspecto de su estructura cognitiva. (Flores, 2012)

Análisis microbiológicos

Los análisis microbiológicos del agua sirven para determinar focos de organismos de importancia para la salud pública así como establecer procedimientos que permitan descubrirlos, identificarlos y destruirlos. (DISA C.A., 2015)

Toma de muestra

Rodier (1990), expone:

Un examen bacteriológico no puede ser válidamente interpretado más que si se efectúa con una muestra correctamente tomada, en un recipiente esterilizado, según un procedimiento preciso evitando toda contaminación accidental, correctamente transportada al laboratorio y analizada sin demora o después de un corto periodo de conservación en condiciones satisfactorias.

La muestra destinada al análisis se toma muy frecuentemente de modo que represente lo más exactamente posible al medio de que proviene, con lo que las bacterias en particular se encuentran en la misma concentración (Rodier, 1990). Para conservar las características de la misma, el tipo de muestra debe ser instantánea (Figura 1), recomendado por la Norma Venezolana COVENIN 2709-02.



Recepción de las muestras

Las muestras deben colectarse en envases limpios, secos, herméticos, tales como frascos de vidrio de boca ancha, bolsas de plástico desechables, cuya capacidad sea adecuada para la cantidad de muestra a recolectar. Cuando se utilicen envases con tapas, éstas deben ser tipo rosca no metálica, es necesario que el material sea insoluble, no absorbente e inerte (Figura 2). (Callañaupa, 2013)

Para la toma de muestras destinadas a ensayos microbiológicos los envases deben ser estériles y si son bolsas plásticas, éstas deben ser de primer uso. (Callañaupa, 2013)



Figura 2. **Envases para recepción de muestras.**
Nota. Instrumentación Científica Técnica, S.L.

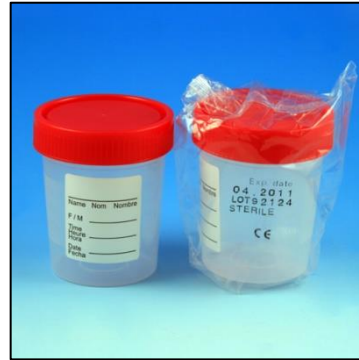


Figura 3. **Identificación de la muestra.** Nota. We Enable Science.

Identificación de la muestra

Las muestras deben estar claramente identificadas mediante un rótulo o etiqueta (Figura 3), consignando, con letra legible y tinta indeleble, los siguientes datos (que deben coincidir con lo declarado en la solicitud de ensayo): identificación de la muestra, lugar de la toma de muestra, fecha y hora de la toma de muestra, número de lote (si fuera el caso) y temperatura de la muestra al momento de ser tomada. (Callañaupa, 2013)

Transporte de la muestra y conservación en el laboratorio

El transporte de las muestras al laboratorio debe efectuarse en un recipiente esterilizado e inerte que ofrezca una protección adecuada contra la contaminación externa y evite el deterioro de las muestras durante el transporte (Figura 4). Si la duración del transporte es mayor a una (1) hora y la temperatura exterior es superior a 10°C, las muestras deben transportarse en neveras con una temperatura entre 4 °C y 6°C (Figura 5). En estas mismas condiciones el análisis bacteriológico se debe realizar en un tiempo máximo de seis (6) horas después de recogida la muestra. Las

muestras que no serán analizadas inmediatamente deben conservarse en el refrigerador. (DISA C.A., 2015)

Rodier (1990) afirma que, el contenido inicial de gérmenes de las aguas puede provocar el riesgo de inducir a modificaciones en la muestra después de la toma, por esta razón recomienda que el análisis bacteriológico se realice lo más rápido posible.



Figura 4. **Transporte de la muestra.** Nota. Leclinvet.



Figura 5. **Conservación de la muestra.** Nota. DISA C.A.

Medio de cultivo

Un medio de cultivo consta de un gel o una solución que cuenta con los nutrientes necesarios para permitir, en condiciones favorables de pH y temperatura, el crecimiento de virus, microorganismos, células, tejidos vegetales o incluso pequeñas plantas (Figura 6). (DISA C.A., 2015)

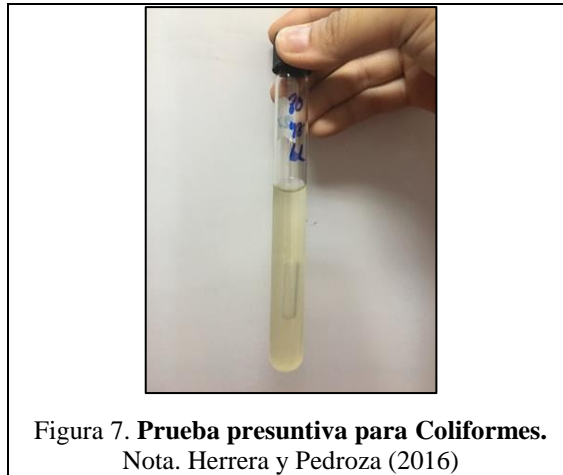


Figura 6. **Medio de cultivo.** Nota. Herrera y Pedroza (2016)

Prueba presuntiva

Es la primera prueba que se le hace a la muestra. Es un análisis cualitativo y da un indicio de la presencia de coliformes, totales y fecales (Figura 7), y pseudomonas aeruginosa en la misma.

La prueba presuntiva se puede aplicar para el examen de muestras de desecho de: aguas negras, efluentes de plantas de tratamiento. Con cierta reserva, para aguas crudas de plantas potabilizadoras. (DISA C.A., 2015)



Prueba confirmativa

Es la prueba posterior a la prueba presuntiva y es la que confirma la presencia de coliformes, totales (Figura 8) y fecales (Figura 9), y pseudomonas aeruginosa en la muestra.

La prueba confirmada sirve para el examen de muestras de agua en las que se conoce de antemano que no es aplicable la prueba presuntiva (como único examen); para muestras de agua potable, en proceso de potabilización, para efluentes clorados

de las plantas de depuración de aguas negras y para aguas de balnearios. (DISA C.A., 2015)



Figura 8. **Prueba confirmativa para coliformes totales.** Nota. Herrera y Pedroza (2016)



Figura 9. **Prueba confirmativa para coliformes fecales.** Nota. Herrera y Pedroza (2016)

Caldo Lauril Sulfato

Medio rico en nutrientes, que permite un rápido desarrollo de los microorganismos fermentadores de la lactosa, aún de los fermentadores lentos (Figura 10). La triptosa es la fuente de nitrógeno, vitaminas, minerales y aminoácidos, la lactosa es el hidrato de carbono fermentable, las sales de fosfato proveen un sistema buffer, y el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico. Es un medio selectivo, ya que el lauril sulfato de sodio inhibe el desarrollo de la flora acompañante. Por la fermentación de la lactosa, se produce ácido y gas, éste último se evidencia al utilizar las campanas Durham.

Es un medio recomendado por A.P.H.A. para detección y recuento de coliformes en aguas, aguas residuales y alimentos. (Laboratorio Britania S.A., 2016)

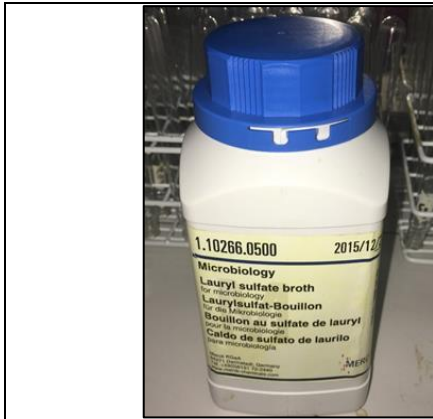


Figura 10. Caldo Lauril Sulfato. Nota. Herrera y Pedroza (2016)

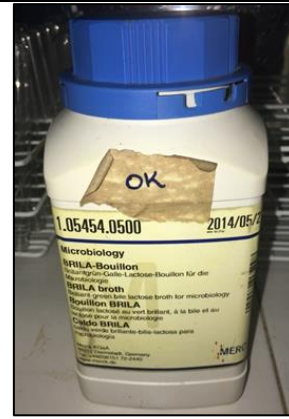


Figura 11. Caldo Bilis Verde Brillante 2%. Nota. Herrera y Pedroza (2016)

Caldo Bilis Verde Brillante 2%

En el medio de cultivo, la peptona aporta los nutrientes necesarios para el adecuado desarrollo bacteriano, la bilis y el verde brillante son los agentes selectivos que inhiben el desarrollo de bacterias gram positivas y gram negativas a excepción de coliformes, y la lactosa es el hidrato de carbono fermentable. Es una propiedad del grupo coliforme, la fermentación de la lactosa con producción de ácido y gas. (Laboratorio Britania S.A., 2016)

Este medio está recomendado para el recuento de coliformes totales y fecales, por la técnica del número más probable (Figura 11).

Mac Conkey Agar

Es un medio de cultivo selectivo y diferencial para bacterias, diseñado para aislar selectivamente bacilos gram negativos de fácil desarrollo, aerobios y anaerobios facultativos (encontrados normalmente en el tracto intestinal). Permite diferenciar bacterias que utilizan o no, lactosa en muestras clínicas, de agua y alimentos. Todas las especies de la familia Enterobacteriaceae desarrollan en el mismo (Laboratorio Britania S.A., 2016). (Figura 12)

Cetrimide Agar

Medio utilizado para el aislamiento selectivo de *Pseudomonas aeruginosa* y de otras especies del género (Figura 13). La fórmula de este medio está desarrollada para favorecer la selección de *Pseudomonas aeruginosa* y estimular la formación de pigmentos. Es un medio en el cual el cloruro de magnesio y el sulfato de potasio promueven la formación de pirocianina, pioverdina y piomelanina de *P. aeruginosa*. La cetrimida es un detergente catiónico que actúa como agente inhibidor, libera el nitrógeno y el fósforo de las células de casi toda la flora acompañante, aunque inhibe también algunas especies de *Pseudomonas*. (Laboratorio Britania S.A., 2016)

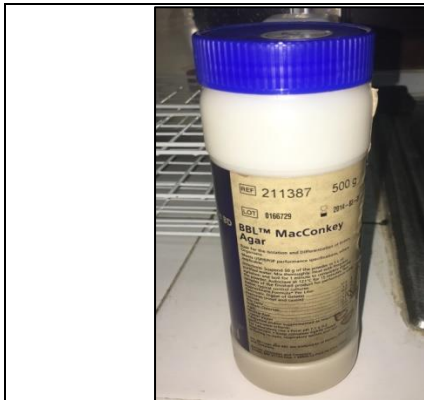


Figura 12. **Mac Conkey Agar**. Nota. Herrera y Pedroza (2016)

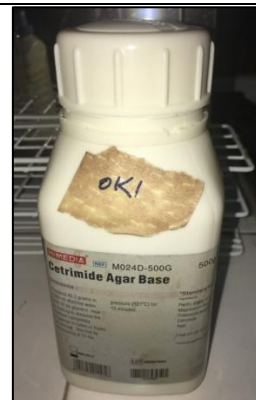


Figura 13. **Cetrimide Agar**. Nota. Herrera y Pedroza (2016)

Definición de términos básicos

Microbiología: estudia los organismos que son demasiado pequeños para ser claramente percibidos a simple vista, y que se denominan microorganismos. (Stanier y otros, 1986)

Aguas residuales: contienen distintos contaminantes que, de no ser tratados, pueden afectar nuestra salud y la calidad del ambiente en el que vivimos. Entre estos

contaminantes encontramos: microorganismos patógenos, materia orgánica, entre otros. (Mariñelarena, 2006)

Las aguas residuales incluyen las aguas usadas domésticas y urbanas, y los residuos líquidos industriales o mineros eliminados, o las aguas que se mezclaron con las anteriores (aguas pluviales o naturales).

Bacteria: Microorganismo unicelular sin núcleo diferenciado, algunas de cuyas especies descomponen la materia orgánica, mientras que otras producen enfermedades. (Stanier y otros, 1986)

Microorganismos: Organismo unicelular solo visible al microscopio. (Stanier y otros, 1986)

Coliformes totales: Son bacterias anaeróbicas facultativas, gramnegativas, no esporulantes, con forma de bacilos, que fermentan la lactosa con producción de gas y acidez en un periodo de 48 horas a 35 °C. (Prescott y otros, 2002)

Coliformes fecales: Son bacterias anaeróbicas facultativas, gramnegativas, no esporulantes, con forma de bacilos, que fermentan la lactosa con producción de gas y acidez en un periodo de 24 a 48 horas a temperaturas entre 35 °C y 44.5 °C. (Prescott y otros, 2002)

Pseudomonas: Las pseudomonas constituyen un género específico de los bacilos, formado por bacterias oxidasa positivas (es decir, que producen esta enzima) y gram negativas (ya que no adquieren una tonalidad azulada cuando se les aplica la coloración de gram). (Stanier y otros, 1986)

Muestra: Parte o cantidad pequeña de una cosa que se considera representativa del total y que se toma o se separa de ella con ciertos métodos para someterla a estudio, análisis o experimentación. (Prescott y otros, 2002)

Esterilización: es un tratamiento que deja el objeto tratado libre de todo organismo vivo. Puede lograrse mediante exposición a agentes letales físicos o químicos o, en el caso especial de las disoluciones, por filtración (Stanier y otros, 1986). El proceso de esterilización debe ser diseñado, validado y llevado a cabo para asegurar que es capaz de eliminar la carga microbiana del producto o un microorganismo más resistente.

Reactivos: Sustancia que, por su capacidad de provocar determinadas reacciones, sirve en los ensayos y análisis químicos para revelar la presencia o medir la cantidad de otra sustancia. (Stanier y otros, 1986)

Fermentación: modificación de compuestos químicos por microorganismos en crecimiento. Crecimiento bacteriano en sí cuando el interés del cultivo es la producción de biomasa. (Stanier y otros, 1986)

Inocular: se refiere a la incorporación de una sustancia en un organismo. (DISA C.A., 2015)

Incubar: Desarrollar el organismo. (DISA C.A., 2015)

Autoclave: es un recipiente de presión metálico de paredes gruesas con un cierre hermético que permite trabajar a alta presión para realizar una reacción industrial, una cocción o una esterilización con vapor de agua. (DISA C.A., 2015)

Asa de platino: es un instrumento de laboratorio que consta de una base que puede estar hecha de platino, acero, aluminio y un filamento que puede ser de nicromo, tungsteno o platino que termina o en un arito de 5 mm o en punta. (DISA C.A., 2015)

Se emplea para transportar o arrastrar o trasvasar inóculos (pequeño volumen que contiene microorganismos en suspensión) desde la solución de trabajo también llamada “solución madre” al medio de cultivo (sólido o líquido) o de un medio a otro (resiembra). También sirve para la realización de frotis.

La cantidad de inóculo que se trasvasa viene determinado por el diámetro del aro final del filamento, que se encuentra calibrado y normalmente oscila entre 0,01 y 0,001 mililitros.

Cultivo: En biología, bacteriología y específicamente en microbiología, un cultivo es un método para la multiplicación de microorganismos, tales como bacterias, hongos y parásitos, en el que se prepara un medio óptimo para favorecer el proceso deseado. (Prescott y otros, 2002)

Agar: es un agente solidificante de medios de cultivo. (Prescott y otros, 2002)

Bacilos gram-negativos: son células en forma de bastón alargado, que a su vez pueden tener varios aspectos: cilíndricos, fusiformes, en forma de maza, entre otros. Son aquellos que no fijan el violeta de genciana porque poseen la capa de lipopolisacárido (peptidoglicano). (Stanier y otros, 1986)

Desinfección: Eliminación de agentes infecciosos que están fuera del organismo por medio de la exposición directa a agentes químicos o físicos. (Sanabria & Acevedo, 2001)

Contaminación: Presencia de un agente infeccioso en la superficie del organismo; también en vestimenta, ropa de cama, juguetes, instrumentos quirúrgicos, apósitos u otros objetos inanimados o sustancias, incluyendo el agua y los alimentos. (Sanabria & Acevedo, 2001)

Marco Normativo Legal

Normas Sanitarias de Calidad del Agua Potable (*Ministerio de Sanidad y Asistencia Social, publicado en Gaceta Oficial de la República de Venezuela N° 36.395 Extraordinario de fecha 13 de febrero de 1998*).

Artículo N° 8

El ente responsable del sistema de abastecimiento de agua potable debe asegurar que esta no contenga microorganismos transmisores o causantes de enfermedades, ni bacterias coliformes termorresistentes (coliformes fecales), siguiendo como criterio de Evaluación de la Calidad Microbiológica la detección del grupo coliforme realizada sobre muestras representativas captadas, preservadas y analizadas según lo establecido en las presentes Normas.

Artículo N° 21

Los análisis a que se refieren las presentes normas deben ser realizados por profesionales idóneos en laboratorios competentes a juicio de la Autoridad Sanitaria, siguiendo las metodologías establecidas en el Método Estándar para el análisis de agua y aguas residuales. (AWWA y APHA).

Normas para la Clasificación y el Control de la Calidad de los Cuerpos de Agua y Vertidos o Efluentes Líquidos (*Decreto 883 del 11 de Octubre de 1995 publicado en Gaceta Oficial de la República de Venezuela N° 5.021 Extraordinario de fecha 18 de diciembre de 1995*).

Artículo N° 41

Párrafo Tercero: Los Laboratorios Ambientales a que se refiere este artículo llevarán a cabo todas las acciones de captación, preservación y análisis de las muestras mediante los procedimientos descritos en las Normas Venezolanas COVENIN o en su defecto en el manual “Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater”, publicado por la American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation, en su más reciente edición, u otro

método equivalente aprobado por el Ministerio del Ambiente y de los Recursos Naturales Renovables.

Determinación del Número más Probable de Coliformes, Coliformes Fecales y de Escherichia Coli (*Norma Venezolana Covenin 1104 aprobada el 14 de Agosto de 1996*).

Objeto

Esta Norma Venezolana contempla el método de ensayo para la determinación del Numero Más Probable (NMP) de bacterias coliformes, de coliformes fecales y de Escherichia coli en alimentos, mediante la utilización de medios líquidos.

Agua Potable. Determinación de Pseudomonas Aeruginosa por el Método del Número más Probable (*Norma Venezolana Covenin 2986 aprobada el 13 de Octubre de 1993*).

Objeto y campo de aplicación

Esta Norma Venezolana contempla el método de ensayo de rutina para la determinación del número más probable de Pseudomonas Aeruginosas en agua potable envasada.

Agua Potable. Toma de Muestras (*Norma Venezolana Covenin 2614 aprobada el 10 de Agosto de 1994*).

Objeto

Esta Norma Venezolana establece los procedimientos que deben seguirse para la captación de muestras de agua potable (destinada a ser utilizada y/o envasada industrialmente) para su posterior análisis físico, químico y microbiológico.

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

El marco metodológico es el procedimiento a seguir para alcanzar el objetivo de la investigación; está compuesto por el tipo y la modalidad de la investigación, fases de la investigación, población y muestra, técnica e instrumento de recolección de datos, validación del instrumento y análisis de los datos.

Tipo de investigación

Según Tamayo y Tamayo (1999), la investigación descriptiva “Comprende la descripción, registro, análisis e interpretación de la naturaleza actual, y la composición o procesos de los fenómenos. El enfoque se hace sobre conclusiones dominantes o sobre cómo una persona, grupo o cosa se conduce o funciona en el presente. La investigación descriptiva trabaja sobre realidades de hecho, y su característica fundamental es la de presentarnos una interpretación correcta”. (p. 46)

Basado en el concepto anterior, el tipo de investigación del presente proyecto es de carácter descriptivo, pues se está partiendo de una explicación detallada y de manera ordenada sobre la situación actual que presentan los estudiantes de Ingeniería Civil de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Carabobo.

Diseño de la investigación

El diseño empleado en este proyecto fue no experimental, de campo, pues los datos que se obtuvieron fueron tomados de la realidad, realizando investigaciones por internet, consultando manuales de laboratorios privados, normas nacionales, consultando con profesionales expertos en microbiología y otros en la realización de manuales, sin manipulación alguna de los mismos, pues, según Arias (1999) la estrategia de campo “consiste en la recolección de datos directamente de la realidad donde ocurren los hechos, sin manipular o controlar variable alguna”.

En definitiva la reciente investigación se encuentra bajo la modalidad de un proyecto factible, en vista, a la realización de una propuesta la cual se coloca en acción para satisfacer una necesidad o resolver un problema (Arias, ob cit), es decir, se elaboró un manual, el cual será una herramienta informativa, cuyo contenido fue todo lo referente a los ensayos microbiológicos más relevantes existentes en el agua, y así cubrir el desconocimiento de los estudiantes. Dicho manual será aplicable en el Laboratorio de Calidad Ambiental de la Escuela de Ingeniería Civil de la Universidad de Carabobo.

Población y muestra

La población o universo se refiere al conjunto para el cual serán válidas las conclusiones que se obtengan” (Arias, 1999). Bajo lo expuesto anteriormente la población seleccionada para el siguiente proyecto es el Laboratorio de Calidad Ambiental de la Facultad de Ingeniería Civil de la Universidad de Carabobo, en donde cabe resaltar que para este proyecto la muestra seleccionada es igual a la población.

Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Arias (1999) señala que “Las técnicas de recolección de datos son las distintas formas o maneras de obtener la información”. Bajo la perspectiva de este autor, es importante tener una técnica adecuada para lograr la información demandada en el proyecto, es por ello, que en la siguiente investigación se consideró anexar dos observaciones, una de manera estructurada y la otra no estructurada, con la finalidad de obtener el por qué es esencial infundir el conocimiento de microbiología del agua, y la otra, para realizar una lista de los materiales que no se encuentran presentes en el Laboratorio de Calidad Ambiental.

Por otra parte “Los instrumentos son los medios materiales que se emplean para recoger y almacenar la información”, también definidos por Arias (1999), partiendo de ese concepto simple se utilizó como instrumento: la memoria fotográfica, guía de entrevista, grabadora, libreta de notas y la matriz FODA, la cual permite obtener un diagnóstico preciso, de la cual se parte para realizar la matriz de estrategias.

Validez del instrumento

Según Corral refiere a que “la validez de un instrumento consiste en que mida lo que tiene que medir” (p. 230), es decir, el mismo está basado en interrogantes que corresponden al objetivo de la investigación. Cabe mencionar que para determinar la efectividad del presente trabajo, se buscó la validación por expertos, pues Palella y Martins (2012) afirman que “en la mayoría de los casos se recomienda determinar la validez mediante la técnica del juicio de experto, que consiste en entregarle a tres, cinco o siete expertos (siempre números impares) en la materia objeto de estudio y en metodología y/o instrucción de instrumentos un ejemplar del (los) instrumento (s)” (p. 155).

Es por ello que se seleccionaron tres (3) expertos para juzgar de manera independiente el contenido de los ítems del instrumento, a saber un Ingeniero Químico especialista en el tema, y dos especialistas en metodología de la investigación. A cada uno de ellos, se le suministró un ejemplar del instrumento (ANEXO C) y su respectivo formato de validación (ANEXO D).

Los criterios a evaluar fueron: (a) coherencia con los objetivos de la investigación, (b) correspondencia de los ítems con lo que se desea determinar, (c) redacción de las instrucciones y de los ítems y (d) presentación y longitud.

Descripción de la metodología

A continuación se exponen las etapas que se establecieron para cumplir el objetivo general de la investigación:

Fase I: Diagnóstico de la necesidad de diseñar un manual de procedimientos para la toma de muestra, análisis e interpretación de los parámetros microbiológicos existentes en el agua para consumo humano, el cual se utilizará en el laboratorio de Calidad Ambiental de la Facultad de Ingeniería Civil.

En esta fase se determinó, a través del estudio del contexto, la necesidad de capacitación que tienen los futuros Ingenieros Civiles acerca de las prácticas microbiológicas de los agentes patógenos con mayor relevancia en el agua. Para ello se contó con la aplicación de instrumentos de recolección de datos pertinentes, tales como la observación participante, la matriz FODA, la cual refleja las fortalezas, oportunidades, amenazas y debilidades que se pueden presentar en dicho proyecto; la mencionada matriz es base esencial para la realización de la matriz de estrategias, cuyo objetivo es dar a conocer ideas constructivas para la mitigación de las

desventajas, además de lo anterior también se efectuó una entrevista a un especialista en materia de ambiente.

Una vez obtenidos los resultados se hicieron los análisis respectivos, se establecieron las conclusiones; que en síntesis, constituyen el diagnóstico del problema planteado.

Fase II: Determinación de la factibilidad técnica para un manual de procedimientos para la toma de muestra, análisis e interpretación de parámetros microbiológicos existentes en el agua para consumo humano, el cual se utilizará en el Laboratorio de Calidad Ambiental de la Facultad de Ingeniería Civil.

En esta etapa se evaluó bajo un estudio técnico los recursos disponibles para realizar este manual, en el siguiente orden:

- **Tamaño del proyecto**

El tamaño del proyecto hace referencia a la capacidad y los factores condicionantes del mismo.

- **Proceso global de transformación**

Comprende la descripción del proceso global de transformación y flujograma del proceso global de transformación.

- **Localización del proyecto**

Abarca a su vez dos aspectos, la macrolocalización y la microlocalización. La macrolocalización del proyecto se refiere a la localización general del mismo, con esta se pretende ubicar la región o territorio en la que el proyecto tendrá influencia con el medio. Y la microlocalización, la cual es la ubicación de la comunidad y el lugar exacto donde se va a desarrollar el proyecto.

Conforme a lo mencionado se realizará el estudio de la factibilidad, de acuerdo al siguiente esquema (Figura 14):



Figura 14. Aspectos considerados en el estudio de factibilidad. Nota. Ledezma y Solá (2014)

Por otra parte se debe resaltar que el presente proyecto solo abarca el diseño del manual como se expuso en los alcances, pero en vista de que éste material será aplicado en el Laboratorio de Calidad Ambiental se efectuó una lista de los materiales disponibles y no disponibles en el mismo para la realización de prácticas microbiológicas. La lista se elaboró mediante una entrevista de manera no estructurada efectuada al personal técnico del laboratorio, en donde se presentaron los distintos instrumentos, materiales y equipos que se usaron para realizar los ensayos microbiológicos en la determinación de coliformes fecales, coliformes totales y pseudomonas aeruginosa, que conforme a las respuestas dadas se iban tachando los materiales que están actualmente en el laboratorio.

Fase III: Diseño de un manual de procedimientos para la toma de muestra, análisis e interpretación de parámetros microbiológicos existentes en el agua para consumo humano, el cual se utilizará en el laboratorio de Calidad Ambiental de la Facultad de Ingeniería Civil.

La última fase se trata del diseño de un manual, en el cual primero se seleccionaron los parámetros microbiológicos a tratar, los cuales fueron algunos de los observados en laboratorios privados y estipulado por la normativa vigente referente al agua potable. La metodología empleada para plasmar la información fue tomada de la nueva propuesta del manual de Laboratorio de Calidad Ambiental, donde la estructuración es similar a la empleada en dicho manual; la breve reseña teórica de cada práctica fue obtenida de libros de microbiología y la serie de pasos a seguir para la determinación de los parámetros microbiológicos fueron obtenidos de las normas COVENIN correspondientes, el manual de DISA C.A. y del método estándar para el examen del agua y aguas residuales.

Análisis de datos

“En este punto se describen las distintas operaciones a las que fueron sometidos los datos que se obtengan”. (Arias, 1999)

Cabe destacar que el análisis de datos se realizó de manera cualitativa, que incluyeron narraciones, descripciones y explicaciones de la situación a tratar, la cual fue analizada y procesada para así tener una mejor visión de la problemática abarcada en el presente trabajo.

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Fase I: Diagnóstico de la necesidad de diseñar un manual para la toma de muestra, análisis e interpretación de los parámetros microbiológicos existentes en el agua para consumo humano, el cual se utilizará en el laboratorio de Calidad Ambiental de la Facultad de Ingeniería Civil.

En vista del evidente déficit académico acerca los estudios microbiológicos al agua que presenta el alumnado de la Escuela de Ingeniería Civil de la Universidad de Carabobo, se observó en primera instancia el pensum (ANEXO A), donde es obvio que la única materia asociada con el tema tratado, es la asignatura Biología y Microbiología Sanitaria , la cual es electiva y no abarca la información deseada, pues, solo habla de manera general de la variedad de bacterias (ANEXO B), es decir, el objetivo de la materia no está enfocado sobre los ensayos microbiológicos efectuados al agua.

Por otra parte considerando el hecho que no se le ha dado importancia a la incorporación de este tema como contenido esencial en una materia como el Laboratorio de Calidad Ambiental, pues en dicha institución solo se realizan análisis físicos –químicos, a pesar que el mismo cuenta con un amplio espacio para realiza estudios microbiológicos no está acondicionado para la realización de dichas prácticas, pues no cuenta con la mayoría de equipos, materiales y reactivos para ejecutar los estudios.

Basado en lo expuesto con anterioridad, surge la inquietud ¿será que los estudios microbiológicos al agua no son esenciales para la formación de un Ingeniero Civil?, en vista de esta inquietud se realizó una entrevista al profesor e Ing. Civil Rafael Dautant, para obtener una respuesta a la duda planteada (ANEXO C).

De acuerdo con Rafael Dautant (comunicación personal, 31 de octubre de 2016) es apreciable el papel que desempeña el medio ambiente en la Ingeniería Civil, en especial el recurso agua, ya que para todo tipo de proyecto se hace uso del mismo. Es por ello que es necesario determinar su calidad a través de dos tipos de estudios, el estudio fisicoquímico y el estudio microbiológico, porque con los resultados de ambos estudios se toman decisiones de gran envergadura. En efecto, un Ingeniero Civil debe estar capacitado para la interpretación de los resultados obtenidos de los estudios efectuados al agua, lo cual da respuesta a la inquietud planteada anteriormente, es decir, los estudios microbiológicos al agua son esenciales en la formación de un Ingeniero Civil (ANEXO C).

Adicionalmente, se aplicó la matriz FODA, lo que permitió visualizar de manera sencilla la situación y permite buscarle una solución (Tabla 1).

Tabla 1
Matriz FODA

Fortaleza	Oportunidades
<ul style="list-style-type: none"> • Interés académico del Departamento de Ingeniería Ambiental de la Universidad de Carabobo para que se realicen las prácticas de microbiología. • La escuela de Ingeniería Civil posee un Laboratorio de Calidad Ambiental donde realizan estudios físicos-químicos y cuenta con un amplio espacio para efectuar en un futuro estudios microbiológicos. • Se conocen métodos analíticos basados en el método estándar para el examen de agua y aguas residuales. • Se cuenta con las Normas Venezolanas COVENIN vigentes. 	<ul style="list-style-type: none"> • Crear un manual de estudios microbiológicos para uso de los estudiantes de Ingeniería Civil de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Carabobo.
Debilidades	Amenazas
<ul style="list-style-type: none"> • Problemas presupuestarios en la Universidad de Carabobo que influyen en la motivación del personal docente y administrativo en proyectos de mejorar el contenido programático de las asignaturas. • Carencia de personal capacitado en estudios microbiológicos para impartir clases sobre el tema. • Ausencia de materiales, instrumentos y equipos para realizar las prácticas microbiológicas. 	<ul style="list-style-type: none"> • No contar con un material de apoyo referente a este tema que pueda ser aplicado a futuro. • Desconocer los requerimientos para implementar las prácticas microbiológicas a futuro.

Nota. Herrera y Pedroza (2016)

En virtud de las variables arrojadas por medio de las herramientas como el pensum, el contenido programático de microbiología y la entrevista, se estableció la necesidad que presentan los alumnos acerca del conocimiento sobre la toma de muestra, análisis e interpretación de los parámetros microbiológicos con características patógenas presentes en el agua, por tal motivo, se debe realizar un manual de microbiología del agua, el cual abarcará los puntos indicados anteriormente, considerando las oportunidades de mejora (no solo para el alumnado y profesores sino también para el laboratorio) extraída de la entrevista; además se determinó a través de la matriz FODA las estrategias a seguir (Tabla 2).

Tabla 2
Matriz de estrategias

	Oportunidades	Amenazas
Fortalezas	<ul style="list-style-type: none"> • Se cuenta con una fuente de información, la cual es el Método Estándar para el examen del agua y aguas residuales. • Llevar a cabo la implementación de este manual. • Determinar las necesidades para implementar las prácticas. 	<ul style="list-style-type: none"> • Conocer los requerimientos para contar con un laboratorio apto para brindar resultados acerca del agua a entidades externas a la universidad, con la finalidad de generar recursos para la conservación del mismo.
Debilidades	<ul style="list-style-type: none"> • A través de los beneficios de este proyecto se busca fomentar la iniciativa de los profesores para un mejoramiento de la universidad en cualquier aspecto. 	<ul style="list-style-type: none"> • Determinar los requerimientos necesarios que permitan la búsqueda de inversión de capital de entes externos a la universidad, con la finalidad de acondicionar el Laboratorio de Calidad Ambiental, para el desarrollo de prácticas microbiológicas.

Nota. Herrera y Pedroza (2016)

FASE II: Determinación de la factibilidad técnica para un manual de procedimientos para la toma de muestra, análisis e interpretación de parámetros microbiológicos existentes en el agua para consumo humano, el cual se utilizará en el Laboratorio de Calidad Ambiental de la Facultad de Ingeniería Civil.

En esta fase se analizó la posibilidad real de la elaboración de este manual, lo que dependió de los recursos disponibles.

Tamaño del proyecto

La elaboración de un manual de procedimientos para la toma de muestra, análisis e interpretación de parámetros microbiológicos existentes en el agua para consumo humano se efectuó en un lapso siete (7) meses, lapso en el cual se realizaron diferentes actividades (Tabla 3) como: búsqueda de la institución disponible para realizar las prácticas, búsqueda de la normativa legal vigente para cada una de las prácticas manipuladas y su adaptación para fines académicos, clases con personal especializado. Cabe destacar que dicho manual estará sujeto a cambios en base de recomendaciones realizadas por personal calificado en el tema.

Tabla 3
Cronograma de Actividades

ACTIVIDADES	AÑO 2016						
	MAYO	JUNIO	JULIO	AGOSTO	SEPT.	OCTUBRE	NOV.
Rev. de bibliografía	■						
Org. Y clasificación de información		■					
Clases con expertos en DISA		■					
Realización de las prácticas en DISA			■				
Realización de memoria fotográfica			■				
Rev. De las Normas COVENIN			■				
Redaccion de las prácticas del manual				■	■		
Redacción de los apéndices					■		
Revisión de prácticas						■	
Rev. final del manual							■
Determinación de los insumos							■

Nota. Herrera y Pedroza (2016)

Los factores que condicionan la elaboración del manual son:

- **Recursos humanos:** Se contó con personal altamente calificado, como el analista en parámetros microbiológicos Simón Colomine, quien explicó las formas correctas de realizar las prácticas de microbiología a través de la observación participante; además del personal del Laboratorio DISA, que suministraron un informe de cómo deberían expresarse los resultados arrojados en las pruebas y al microbiólogo Luís Amays, el cual brindó información acerca de los tipos de parámetros a estudiar en el agua establecido por las normas vigentes.
- **Recursos documentales:** Se contó con muchas fuentes como el manual de DISA, en el cual se observó todo lo referente a los ensayos de microbiología; el manual de Calidad Ambiental de la Universidad de Carabobo, donde se pudo notar la estructuración y el método empleado para que los estudiantes tengan una mejor recepción del contenido; los libros de microbiología suministrados por la Universidad de Carabobo, de donde se extrajo información de los agentes patógenos.
- **Recursos institucionales:** se contó con el apoyo y las instalaciones del laboratorio de Diseños Ambientales (DISA C.A.).

Proceso global de transformación

Es el proceso técnico empleado en el proyecto para conseguir el beneficiario principal, a través de la función de transformación. Con respecto a los beneficiarios, se puede decir que se cuenta con un grupo directamente afectado, el grupo principal son los estudiantes de ingeniería civil, quienes contarán con un manual nuevo y un contenido nuevo, que los capacite en la realización de prácticas microbiológicas. Este proceso se indica a través del siguiente gráfico (Figura 15):

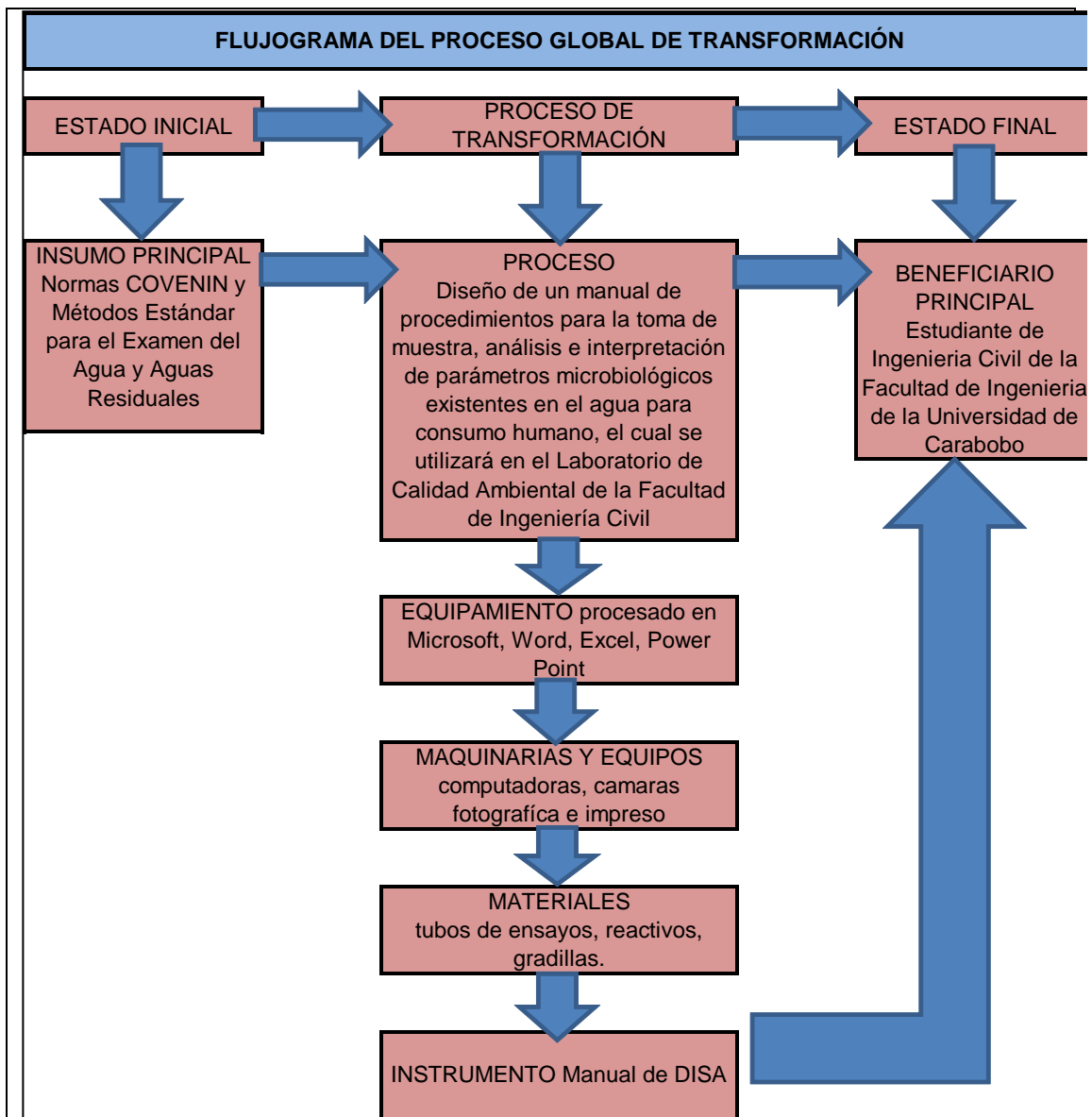


Figura 15. **Flujograma del Proceso Global de Transformación.** Nota. Herrera y Pedroza (2016)

En última instancia se realizó un análisis de costos (Tabla 4), el cual muestra la inversión aproximada en el diseño de la propuesta. Cabe destacar que el costo referente a los materiales, reactivos, equipos y toma de muestra no se incluyen, ya que, estos se encontraban disponibles en el laboratorio DISA C.A.

Tabla 4*Análisis de Costos*

Recursos económicos	Costos aproximados, Bsf
Pen Drive	5000,00
internet	5000,00
Impresiones	8000,00
Traslado al laboratorio (DISA)	10000,00
Total aproximado	28000,00

Nota. Herrera y Pedroza (2016)

Como se explicó en el capítulo III, el estudio de factibilidad está enfocado solo a la elaboración del manual de estudios microbiológicos al agua, sin embargo se realizó una lista de instrumentos, materiales, reactivos y equipos disponibles y no disponibles en el Laboratorio de Calidad Ambiental (Tabla 5), pues en dicha institución es donde se desea implementar, a futuro, el manual; además de la lista, se efectuó un análisis de costos basado en los materiales, equipos y reactivos que se no se encuentran disponibles en el laboratorio (Tabla 6). Cabe destacar que cuando se habla de la disponibilidad, bien sea de un reactivo, material o equipo, significa que se encuentra lo requerido para realizar la práctica, y si no se encuentra disponible significa que no hay en ninguna cantidad.

Se debe resaltar que los precios de estos reactivos, instrumentos y equipos se obtuvieron del proveedor Thomas Scientific a través de su página web. Estos precios se calcularon en bolívares por medio de la tasa de cambio SIMADI 661,487 BsF/\$ para la fecha 24 de noviembre del 2016.

Tabla 5

Lista de equipos, materiales y reactivos, para la realización de prácticas microbiológicas.

Equipos, materiales y reactivos	Disponibilidad
Alcohol isopropílico	no
Agua destilada	si
Caldo Lauril Sulfato	no
Caldo Bilis Verde Brillante	no
Cetrimide Agar	no
Mac Conkey Agar	no
Guantes	no
2 Gradillas	si
Asa de platino	no
30 Tubos Durham	no
30 Tubos de ensayo	no
10 Capsulas de Petri	no
Lentes de seguridad	no
Matraz volumétrico de 500 ml	si
Cilindro graduado de 500 ml	si
Boquilla de 1 ml, 0.1 ml	no
Nevera	si
Mechero	si
Incubadoras	si
Autoclaves	no
Pipetas	si
Propipeta	si
Micropipetas	no
Medidor de pH	si
Balanza analítica	no
Agitador magnético	si
Campana con luz ultravioleta	no

Nota. Herrera y Pedroza (2016)

Tabla 6

Análisis de costos de reactivos, instrumentos y equipos no disponibles en el laboratorio.

Reactivos	Cantidad (g)	Precio (\$)	Precio (BsF)
Caldo Lauril Sulfato	500	68,69	45437,54
Caldo Bilis Verde Brillante 2%	500	125,46	82990,16
Cetrimide Agar	500	141,76	93772,40
Mac Conkey Agar	500	114,59	75799,80

Instrumentos y equipos	Cantidad (u)	Precio (\$)	Precio (BsF)
Guantes	100	18,38	12158,13
Asa de platino	1	41,48	27438,48
Tubo Durham	72	50,04	33100,81
Tubo de ensayo	48	224,91	148775,04
Cápsula de Petri	500	168,17	111242,27
Lentes de seguridad	10	68,45	45278,79
Boquilla de 1 ml	500	13,62	9009,45
Boquilla de 0,1 ml	1000	16,35	10815,31
Autoclave	1	520,28	344158,46
Micropipeta	1	166,24	109965,60
Balanza analítica	1	1697,57	1122920,49
Campana con luz ultravioleta	1	3820,54	2527237,54

Materiales	Cantidad (ml)	Precio (\$)	Precio (BsF)
Alcohol isopropílico	2000	-	3000,00

TOTAL 4803100,26

Nota. Thomas Scientific (2016)

Se dispone a continuación la composición de cada uno de los reactivos que se utilizaron en cada estudio microbiológico. (Tabla 7, Tabla 8, Tabla 9 y Tabla 10).

Tabla 7

Composición Caldo Lauril Sulfato.

Fórmula (en gramos por litro)		Instrucciones
Triptosa	20.0	Suspender 35,6 g del polvo en 1 litro de agua destilada. Dejar reposar 5 minutos. Calentar a ebullición hasta la disolución total. Distribuir en tubos conteniendo tubos de fermentación. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121°C.
Lactosa	5.0	
Cloruro de sodio	5.0	
Lauril sulfato de sodio	0.1	
Fosfato dipotásico	2.75	
Fosfato monopotásico	2.75	
pH final: 6.8 ± 0.2		

Nota. Laboratorios Britania. S.A. (2016)

Tabla 8*Composición Caldo Bilis Verde Brillante 2%.*

Fórmula (en gramos por litro)		Instrucciones
Bilis de buey deshidratada	20.0	Suspender 40 g del polvo deshidratado por litro de agua destilada. Disolver y distribuir 10 ml por tubo con campanita de Durham. Preparar además, el medio a doble concentración. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.
Lactosa	10.0	
Peptona	10.0	
Verde brillante	0.0133	
pH final: 7.2 ± 0.2		

Nota. Laboratorios Britania. S.A. (2016)

Tabla 9*Composición Mac Conkey Agar.*

Fórmula (en gramos por litro)		Instrucciones
Peptona	17.0	Suspender 50 g del polvo por litro de agua destilada. Reposar 5 minutos y mezclar hasta uniformar. Calentar suavemente y hervir 1 a 2 minutos hasta disolver. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.
Pluripeptona	3.0	
Lactosa	10.0	
Mezcla de sales biliares	1.5	
Cloruro de sodio	5.0	
Agar	13.5	
Rojo neutro	0.03	
Cristal violeta	0.001	
pH final: 7.1 ± 0.2		

Nota. Laboratorios Britania. S.A. (2016)

Tabla 10*Composición Cetrimide Agar Base.*

Fórmula (en gramos por litro)		Instrucciones
Peptona de gelatina	20.0	Suspender 45,3 g del polvo por litro de agua destilada. Agregar 10 ml de glicerina. Dejar reposar 5 minutos. Calentar agitando frecuentemente y hervir durante 1 minuto. Distribuir en tubos o frascos y esterilizar en autoclave 15 minutos a 121°C.
Cloruro de magnesio	1.4	
Sulfato de potasio	10.0	
Agar	13.6	
Cetrimida	0.3	
pH final: 7.2 ± 0.2		

Nota. Laboratorios Britania. S.A. (2016)

Localización del proyecto

Se encuentra situado en el Municipio Naguanagua - Estado Carabobo (Figura 16); específicamente en el Departamento de Ingeniería Ambiental de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Carabobo (Figura 17).

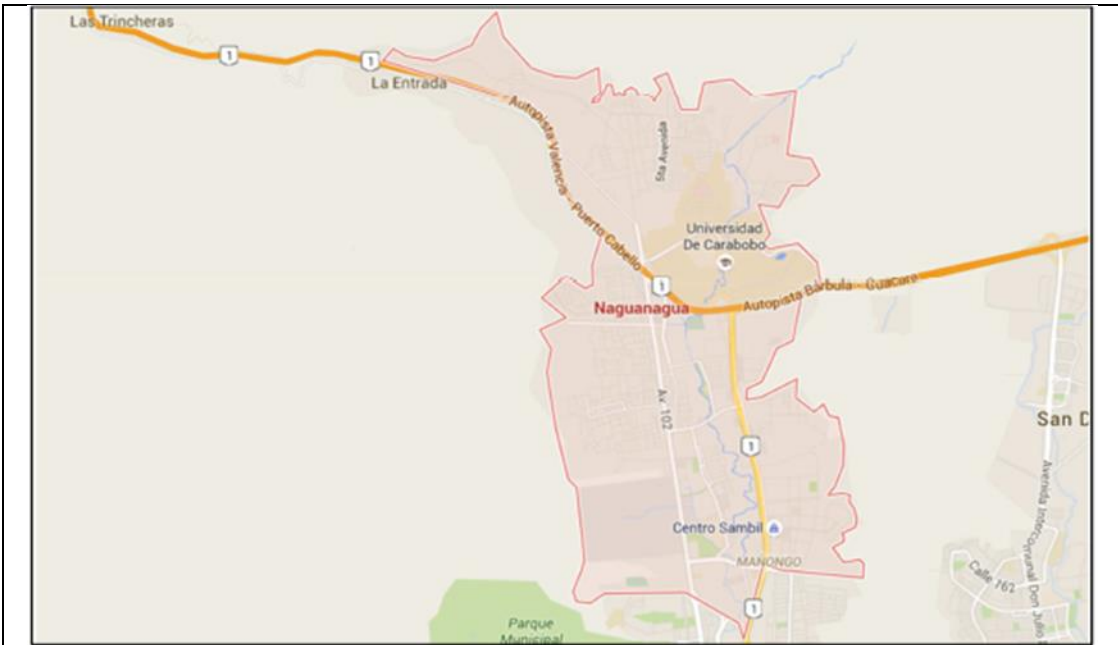


Figura 16. **Macrolocalización.** Nota. Google Earth (2016)

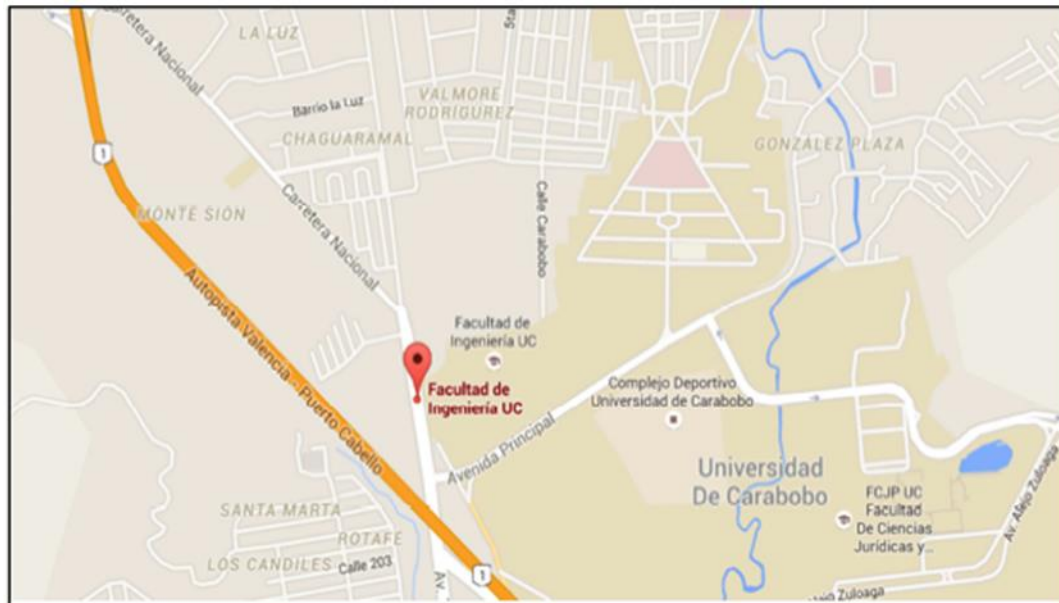


Figura 17. **Microlocalización.** Nota. Google Earth (2016)

FASE III: Diseño de un manual de procedimientos para la toma de muestra, análisis e interpretación de parámetros microbiológicos existentes en el agua para consumo humano, el cual se utilizará en el Laboratorio de Calidad Ambiental de la Facultad de Ingeniería Civil.

A continuación se presentan los objetivos trazados para el diseño del manual

Objetivos del diseño

- Abarcar en el manual los análisis microbiológicos establecidos por la Norma Sanitaria de Calidad del Agua Potable, y por lo observados en otros laboratorios.
- Emplear una metodología donde el estudiante aprenda y entienda de manera rápida y sencilla las prácticas.
- Enseñar al estudiante a interpretar los resultados de las prácticas existentes en el manual.
- Elaborar el manual de procedimientos para la toma de muestra, análisis e interpretación de parámetros microbiológicos existentes en el agua para consumo humano.

Bajo la directiva anterior, se estableció la estructura que presentará el manual de ensayos microbiológicos. A continuación se presenta la estructura generada en el manual:

Considerando los ensayos realizados en el laboratorio DISA C.A., donde se rigen por lo establecido en el Métodos Estándar para el Examen del Agua y Aguas Residuales, y en la normativa legal vigente, necesarios para la determinación de la calidad del agua, se establecieron 3 prácticas, las cuales son: Coliforme Total, Coliforme Fecal y Pseudomonas aeruginosa. Adicionalmente se anexó información base sobre la toma muestra y las normativas del laboratorio donde posiblemente se aplique dicho manual.

En cuanto a la estructuración de las prácticas, inicialmente se observan los objetivos con la finalidad de orientar a los estudiantes en la organización del trabajo realizado en el laboratorio y cómo deben concluir los resultados del informe. Una vez terminado los objetivos, continúa la introducción de la práctica donde hace reseña al microorganismo a tratar y el método por el cual es determinado, seguido de un marco teórico, el cual abarca las definiciones más relevantes y un resumen del método para determinarlo. Inmediatamente, una lista de todo los materiales, instrumentos, equipos y reactivos que se utilizarán en la práctica. Posteriormente, el procedimiento a efectuar para determinar el microorganismo.

Finalmente se tienen los resultados a estudiar, un cuestionario para incentivar al estudiante a buscar más información y la bibliografía de donde se extrajo el contenido. Cabe resaltar que el manual consta de imágenes que permiten al estudiante tener una idea de cómo será desarrollada la práctica.

Cabe destacar que la estructuración de cada práctica se redactó en base a lo observado en DISA C.A. para cada análisis, tomando en consideración los procedimientos establecidos por el Métodos Estándar para el Examen del Agua y Aguas Residuales, en conjunto con la Norma Venezolana COVENIN correspondiente a cada parámetro, es decir, el manual propuesto es una combinación de ambos.

La Norma COVENIN 1104-93 describe que dependiendo del estado en el que se encuentre el reactivo, líquido (caldo) o sólido (agar), se utilizará el material adecuado para el mismo, y se puede observar en el Métodos Estándar la aplicabilidad de esta misma condición en la Técnica de Tubos Múltiples para *Pseudomonas Aeruginosa* (pág. 9-53), señalando que para la prueba confirmatoria se puede realizar un medio en caldo o en agar (pág. 9-54), y como se explicó antes, para caldo se realiza en tubos y para agar en placas o cápsulas de petri.

Adicionalmente se tiene el hecho del uso de diferentes reactivos o medios para un mismo fin, lo cual se ajusta a lo disponible en la institución que efectúa el estudio, lo que se evidencia tanto en las Normas COVENIN como en el Métodos Estándar, pues establecen opciones de tipos de reactivos que pueden usarse para un mismo análisis sin variar el procedimiento y por ende no hay variación en los resultados que se desean obtener. El objetivo principal de cada ensayo es hacer crecer el agente en el medio, con el tipo de reactivo determinado para ello.

CAPÍTULO V

LA PROPUESTA

**MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA LA TOMA DE MUESTRA,
ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS PARÁMETROS
MICROBIOLÓGICOS MÁS RELEVANTES EXISTENTES EN EL AGUA
PARA CONSUMO HUMANO**

**Elaborado por: Dorimar Herrera
Juset Pedroza**

Noviembre de 2016

ÍNDICE

Contenido	Pág.
Introducción.....	57
Muestreo y preservación de la muestra.....	59
Práctica 0. Introducción al laboratorio.....	64
Práctica 1. Coliformes Totales.....	72
Práctica 2. Coliformes Fecales.....	83
Práctica 3. Pseudomonas Aeruginosa.....	89
Anexo A. Términos básicos.....	97

INTRODUCCIÓN

El estudio de la microbiología es un campo muy amplio que posee varias áreas de aplicación en las que se destaca la microbiología médica, industrial, agrícola, de alimentos y ambiental. Cada una de estas áreas posee un objeto de estudio específico el cual se relaciona con un conjunto de problemas particulares. Por otra parte la Microbiología Ambiental considera el diagnóstico de microorganismos patógenos presentes en aquellos desechos, sistemas o subproductos de estos, que pueden entrar por diferentes vías en contacto con el humano (Sanabria & Acevedo, 2001).

A nivel mundial, el 80% de las enfermedades infecciosas y una tercera parte de las defunciones causadas por éstas se deben al uso y consumo de agua insalubre. La falta de higiene y la carencia o el mal funcionamiento de los servicios sanitarios son algunas de las razones por las que la diarrea continúa representando un importante problema de salud en países en desarrollo. El agua y los alimentos contaminados son considerados los principales vehículos involucrados en la transmisión de bacterias, virus o parásitos.

Esto generalmente ocurre en sistemas potables públicos y privados cuando realizan la toma de aguas superficiales (lluvia, calas, ríos, lagos, etc.), las cuales pueden estar contaminadas por restos de animales infectados o por las descargas residuales, domésticas e industriales. Debido al impacto que representa en la humanidad la ingesta de este líquido contaminado, es imprescindible efectuarle análisis tanto de carácter físico-químico como microbiológicos, en donde la ingeniería civil interpreta un papel crucial evaluando, previniendo, minimizando y/o mitigando los impactos ambientales que las obras producen.

En atención a lo expuesto, todo ingeniero civil debe dominar los estudios realizados a este vital líquido, ya que partiendo de dicha información se le puede dar un tratamiento certero y prevenir una pandemia de cualquier microorganismo

existente en el agua. Por otra parte, es importante mencionar, el manejo del recurso agua en su práctica profesional, desde evaluar su calidad para fines de construcción hasta el suministro para consumo humano, así como el control de los vertidos líquidos relacionados a sus actividades. Por lo tanto, entra en juego la importancia de determinar la calidad de éste recurso, mediante la obtención de cada una de sus características. (López, 2016)

Para la comprensión del uso de los parámetros de calidad y la interpretación de los resultados desde el punto de vista ambiental es imprescindible comprender la metodología y técnicas recomendadas en su determinación. En éste sentido, se emplearán en el Laboratorio de Calidad Ambiental prácticas donde se aplicarán los análisis microbiológicos.

El presente manual consta de tres (3) ensayos principales a realizar los cuales son coliforme totales, coliformes fecales y *Pseudomonas Aeruginosa*, regidos por lo establecido en el Métodos Estándar para el Examen del Agua y Aguas Residuales, en la Norma Venezolana COVENIN 1104-96 *Determinación del Número Más Probable de Coliformes, Coliformes Fecales y de Escherichia Coli* y en la Norma Venezolana COVENIN 2986-1993 *Agua Potable. Determinación de Pseudomonas Aeruginosa por el método del número más probable.*

MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

El objetivo del muestreo es recolectar una porción de material lo suficientemente pequeño, en volumen, para ser transportado convenientemente, pero lo bastante grande para propósitos analíticos, mientras que aun represente con precisión al material que está siendo muestreado. Este propósito implica que las proporciones relativas o las concentraciones de todos los componentes relevantes serán iguales, en las muestras como en el material que está siendo muestreado, y que esta será manejada de tal forma que no ocurran cambios significativos en su composición, antes de que se realice el muestreo.

El agua puede muestrearse bajo diversas condiciones, por lo que, no existe un método único que pueda aplicarse de manera universal. El método lugar y tiempo de muestreo deben combinarse de tal manera que los resultados obtenidos satisfagan el propósito para el que se decidió captar la muestra. El agua no tiene una composición fija, si no que presenta cambios apreciables que dependen de múltiples factores como son origen, temperatura, contaminación, entre otros.

Tipos de muestras

Para la caracterización de cuerpos de agua, corrientes de proceso o aguas residuales se utilizan tres tipos de muestras: instantáneas, compuestas e integradas.

a. Muestras instantáneas

Refleja las características del cuerpo de agua, corrientes de proceso o aguas residuales en el momento de su captación. Se captan muestras instantáneas cuando:

- ✓ La corriente no fluye continuamente, por ejemplo un efluente o afluente intermitente o un tanque que se vacía periódicamente.
- ✓ Las características de la corriente son relativamente constantes.

- ✓ Se desean determinar condiciones extremas, referidas tanto al caudal como a la composición.
- ✓ Se desean analizar parámetros como gases disueltos, cloro residual, sulfuro, temperatura, análisis microbiológicos, análisis radiológicos o cualquier otra característica que pueda cambiar durante el periodo de almacenamiento.
- ✓ Se observan descargas imprevistas.
- ✓ Lo exijan las normativas de control.

b. Muestra compuesta

Representa las características promedio de un cuerpo de agua, corriente o agua residual durante el periodo de captación. Para la preparación de la muestra compuesta se captan submuestras instantáneas durante el periodo que se desea evaluar. Antes de la combinación de las submuestras, debe verificarse que los parámetros de interés no varíen significativamente durante el periodo de muestreo. Esta puede clasificarse en tres tipos:

- proporcional al caudal,
- a volumen constante
- casos especiales.

c. Muestra integrada

Consiste en la mezcla de muestras instantáneas captadas en diferentes sitios simultáneamente. Se utiliza especialmente en los ríos, lagos y aguas costeras donde ocurren variaciones en la composición dependiendo de la profundidad y el ancho de la corriente. Estas pueden ser captadas a diferentes profundidades de una masa de agua, en un lugar específico (perfil vertical); o ser captadas a una profundidad particular de una masa de agua, en diferentes lugares (perfil horizontal).

Modalidad de captación

La captación de la muestra puede realizarse en forma manual o automática.

a. Captación manual

La captación se realiza directamente por el personal involucrado en el programa. Permite observar situaciones variables o no previstas y hacer cambios en la programación, además involucra un equipo mínimo para la captación. Resulta más económica cuando se trata de programas de caracterización relativamente sencillos, donde el número de puntos y la frecuencia de captación de la muestra es reducida. No requiere mantenimiento. Cuando sea necesario, se pueden captar muestras adicionales o modificar el programa de captación.

Entre las desventajas, se puede resaltar el requerimiento de técnicos de campo entrenados, y la posibilidad de ocurrencia de errores humanos debido a las dificultades de captación y el cansancio. Puede ser costoso en términos de gastos de personal y el tiempo consumido para los programas de muestreo rutinarios o a gran escala.

b. Captación automática

La captación se realiza con equipos de muestreo automáticos diseñados especialmente para ello. Es útil cuando es necesario captar en muchos sitios simultáneamente o se requiera un registro más continuo. Los equipos se pueden programar para preparar muestras compuestas en función del caudal o del tiempo. Entre las ventajas se puede mencionar consistencia de la captación, disminución de los posibles errores causados por manipulación de las muestras, requiere poco personal, permite mayor frecuencia de captación de muestras en un mayor número de sitios.

Por otra parte, se pueden destacar como desventajas el requerimiento permanente de inspección y mantenimiento de la fuente de energía, y los equipos son susceptibles a obstrucción por presencia de sólidos, el tamaño es restringido e inflexible, y son susceptibles al hurto o daño, representan un alto costo de inversión y no permite observar situaciones variables o no previstas y hacer cambios en la programación.

Control de la muestra

Se debe llevar un registro en una bitácora con los datos indicados en la etiqueta del frasco, así como la siguiente información:

- Identificación del punto o sitio de muestreo.
- Temperatura ambiente y temperatura del agua (termómetro)
- pH (usar cintas indicadoras de pH)
- Presencia de cloro residual (inspección de color y olor del agua)
- Tipo de análisis a efectuar
- Técnica de preservación empleada.
- Observaciones relativas a la toma de muestra, en su caso, y nombre de la persona que realiza el muestreo.

Preparación de envases para la toma de muestras

Los frascos de muestreo deben ser de vidrio resistente o refractario, de boca ancha, preferiblemente con tapas de rosca de materiales que no produzcan compuestos tóxicos durante la esterilización.

Para evitar la acción bactericida del cloro residual, se usa tiosulfato de sodio, el cual se aplica a los frascos limpios y secos antes de la esterilización en una

cantidad que proporcione una concentración aproximada de 100 mg/l (se logra agregando 0,1 ml de solución de tiosulfato de sodio al 10%).

Identificación de las muestras

Deben identificarse los frascos o envases con la siguiente información:

- a. Número de registro para identificar la muestra
- b. Fecha y hora del muestreo
- c. Temperatura de la muestra

Almacenamiento de la muestra

Las muestras se deben almacenar asegurando que las características a ser analizadas no se alteren. Casi siempre es necesaria la refrigeración (4°C), siendo ésta una buena medida de preservación para la muestra. Preferiblemente usar hielo comercial al momento de trasladar la muestra desde el lugar de captación al laboratorio.

PRÁCTICA 0

INTRODUCCIÓN AL LABORATORIO

I. OBJETIVOS GENERALES

1. Examinar las normas de bioseguridad y las medidas en caso de emergencia que se deben seguir en las prácticas.
2. Identificar los materiales y/o equipos de uso frecuente en el laboratorio de calidad ambiental.

II. INTRODUCCIÓN

El laboratorio es un espacio para la investigación formativa en el cual se llevan a cabo diversas actividades académicas que favorecen el proceso de enseñanza-aprendizaje de alumnos y profesores. Por sus propias características, el trabajo en el laboratorio presenta una serie de riesgos de origen y consecuencias muy variadas, relacionados básicamente con las instalaciones, los productos que se manipulan y las actividades que se realizan con ellos. (Farrás & Solá)

Con respecto a los productos debe tenerse en cuenta que pueden ser perjudiciales para la salud, aunque normalmente se emplean en pequeñas cantidades y de manera discontinua. La organización del laboratorio debe permitir la correcta gestión de la prevención de riesgos en el mismo, es decir el laboratorio debe estar adecuadamente jerarquizado para que la aplicación del principio de la seguridad se pueda establecer sin problemas. (Farrás & Solá)

Esta situación conduce necesariamente a una atención especial por parte de toda persona que haga uso del laboratorio, lo cual podría concretarse en una serie de precauciones que deben mantenerse permanentemente durante el trabajo,

considerando minuciosamente los posibles incidentes que pueden ocurrir en el desarrollo de las diferentes técnicas.

En atención a lo expuesto, la presente práctica tiene como objetivo establecer los aspectos normativos que regulen el funcionamiento y los servicios que ofrece el laboratorio, así como también mostrará al estudiante aquellos instrumentos y materiales de uso común y se dará a conocer las normas de bioseguridad a seguir en el mismo.

III. NORMAS DE BIOSEGURIDAD A SEGUIR EN EL LABORATORIO

1. Entrar al laboratorio en forma ordenada, dejar las carteras, libros y otros objetos personales en el lugar que se les indique para tal fin.
2. Llevar puesta la bata de laboratorio en todo momento. La misma debe permanecer completamente cerrada.
3. Limpiar y desinfectar las superficies de trabajo, antes de comenzar y al finalizar la sesión práctica.
4. Lavar las manos con agua y jabón antes de realizar las actividades programadas, antes de salir del laboratorio y siempre después de manejar materiales que se sabe o se sospecha que son contaminantes.
5. Trabajar cerca del mesón, adoptando una buena postura y estando físicamente cómodo.
6. Llevar un calzado apropiado, preferiblemente cerrado y de suela antideslizante en las áreas de laboratorio.
7. Evitar llevar accesorios que podrían ser fuente de contaminación (por ejemplo joyas).
8. Recoger el cabello largo.
9. Evitar desplazamientos innecesarios, movimientos bruscos. Hablar sólo lo indispensable.

10. No comer, beber, fumar, almacenar comida, objetos personales o utensilios, aplicarse cosméticos ni ponerse o quitarse lentes de contacto en ningún área del laboratorio.
11. Conocer el manejo de todos los equipos y reactivos a emplear antes de iniciar las actividades indicadas en la práctica. Si usted tiene alguna duda, diríjase al profesor.
12. Mantener el área de trabajo ordenada, libre de libros, cuadernos u objetos personales, exceptuando aquellos equipos y materiales necesarios para la realización del trabajo práctico.
13. Tener cuidado con el alcohol cuando manipule el mechero. Nunca debe dejar éste desatendido.
14. Regresar los reactivos y equipos empleados (microscopio, mechero, etc.), limpios y de manera ordenada a su respectivo lugar una vez finalizada la actividad. Reporte cualquier daño de los mismos al profesor.
15. Colocar los materiales de vidrio contaminados en los recipientes dispuestos para tal fin, por ejemplo: las pipetas en los pipeteros, tubos y placas de Petri en las ollas de desecho, etc.
16. No usar ningún reactivo que no esté debidamente identificado, verificar las etiquetas de los mismos y estar seguro de cómo emplearlo.
17. No devolver sustancias a sus envases originales.
18. Emplear la propipeta al medir líquidos. Está rigurosamente prohibido pipetear con la boca. De igual manera las pipetas tendrán tapones de algodón para reducir la contaminación de estos dispositivos de pipeteo.
19. Realizar solamente aquellas actividades indicadas por el profesor, no llevar a cabo experimentos no autorizados.
20. Reportar inmediatamente cualquier accidente al profesor (derrame de material contaminado, heridas, quemaduras, etc.), ninguno puede ser catalogado como menor.
21. Reducir al mínimo la formación de aerosoles durante la realización de cualquier trabajo práctico.

22. Extremar las precauciones cuando se utilicen agujas y jeringas para evitar la inoculación accidental y la generación de aerosoles durante su manipulación y desecho.
23. Emplear técnicas asépticas para el manejo de cultivos de microorganismos.
24. Nunca intente conocer el sabor de los reactivo.
25. Las quemaduras de piel causadas por objetos calientes, deben ser tratadas con solución de ácido bórico.
26. Permita que los objetos calientes se enfríen antes de tocarlos.
27. Los grifos de agua han de permanecer cerrados mientras no se utilicen, los equipos se deben apagar al terminar su uso.

IV. MEDIDAS EN CASO DE EMERGENCIA

A continuación mencionaremos los pasos que se deben seguir en caso de que ocurran los siguientes accidentes:

- a. Derrame de material biológico sobre el cuerpo:
 - ✓ Remover la ropa inmediatamente.
 - ✓ Lavar vigorosamente el área expuesta con agua y jabón por un minuto.
 - ✓ Reportar el incidente al profesor.
 - ✓ Buscar atención médica si es necesario.
 - ✓ La ropa contaminada debe ser colocada en una solución desinfectante antes de ser lavada.

- b. Salpicaduras en los ojos con materiales biopeligrosos:
 - ✓ Lavar inmediatamente el globo ocular e interior de la superficie del párpado con abundante agua durante 15 minutos aproximadamente. Abrir el ojo para asegurar efectivamente el lavado, comenzando por los párpados.
 - ✓ Reportar el incidente al profesor.

- c. Cortadas menores y heridas por pinchazo:

- ✓ Lavar vigorosamente la herida con agua y jabón por varios minutos.
 - ✓ Aplicar un antiséptico adecuado
 - ✓ Reportar el incidente al profesor.
 - ✓ Buscar atención médica inmediatamente.
- d. En el caso de derrames:
- ✓ Reportar el incidente al profesor.
 - ✓ Colocarse guantes y cubrir con papel absorbente el área del derrame.
 - ✓ Verter un desinfectante adecuado y dejar actuar por el tiempo necesario.

V. MATERIAL E INSTRUMENTOS DE USO FRECUENTE EN EL LABORATORIO

A continuación se presentan los instrumentos de uso común en el laboratorio, identifique cada uno usando la imagen mostrada:



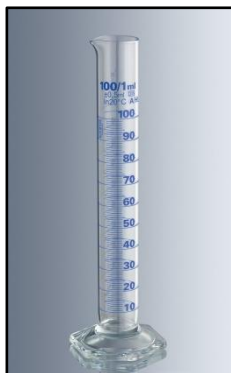
Tubos Durham



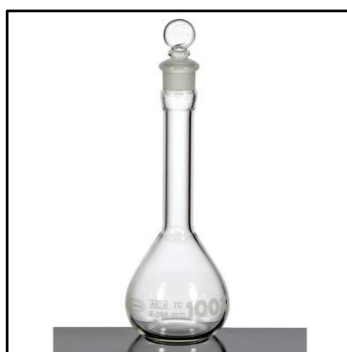
Tubos de ensayo



Pipeta



Cilindro graduado



Matraz volumétrico



Cápsula de Petri



Asa de platino



Mechero



Micropipeta



Boquillas para pipetas



Propipeta



Agua destilada



Alcohol isopropílico



Piseta



Gradilla



Guantes



Lentes de seguridad



PH-metro



Agitador metálico



Balanza Analítica



Campana con luz ultravioleta



Autoclave



Incubadora



Nevera

Bibliografía

- DISA C.A. (2015). *MANUAL DE BACTERIOLOGIA. Analisis de aguas y aguas de desecho*. Valencia.
- Farrás, R., & Solá, G. (s.f.). *Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo*. Recuperado el 27 de Octubre de 2016, de http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/NT/TP/Ficheros/401a500/ntp_432.pdf
- López, D. (2016). *ELABORACIÓN DE UNA PROPUESTA PARA LA ENSEÑANZA EN EL LABORATORIO DE CALIDAD AMBIENTAL DE LA ESCUELA DE INGENIERÍA CIVIL, FACULTAD DE INGENIERÍA, UNIVERSIDAD DE CARABOBO*. Valencia.

PRÁCTICA 1

COLIFORMES TOTALES

I. OBJETIVOS GENERALES

1. Conocer el método Número Más Probable (NMP), para la determinación de organismos coliformes totales en muestra de agua.
2. Aplicar el procedimiento para la determinación de organismos coliformes totales en muestras de agua.
3. Analizar conclusiones y recomendaciones, realizando una comparación entre la norma legal vigente y los resultados generados en el laboratorio.

II. INTRODUCCIÓN

El agua contaminada con agentes patógenos se ha convertido en una problemática de primer orden, pues la misma puede afectar la salud de la población al ser consumida. Por éste motivo las instituciones dedican su tiempo a investigar las distintas formas de conseguir información acerca de la salubridad de este vital líquido.

En muchas ocasiones las irregularidades presentes en el objeto de estudio es una manera de manifestar una alteración de algún tipo, de este modo si se tiene definida una anomalía se podría descifrar que tipo de alteración presenta la muestra y cómo se puede combatir. Una anomalía muy frecuente en el agua es la presencia de organismos coliformes mayor o igual a 1,8 NMP/100 ml. La mayoría de las bacterias coliformes probablemente no causan enfermedades, sin embargo, estas bacterias son usadas como indicadores en pruebas de agua porque su presencia señala que los organismos patógenos que si causan enfermedades pudieran estar en el agua. La presencia de algunos tipos de bacterias coliformes señala la evidencia de excremento

o desechos de alcantarillas, ya que usualmente los organismos causantes de enfermedades provienen de allí (Division de Salud Pública Carolina del Norte, 2009).

En conclusión los Coliformes son un grupo de bacterias que comparten características bioquímicas en común y son útiles como microorganismos indicadores de sanidad de alimentos y agua, encontrándose que mientras mayor sea el número de coliformes en agua, mayor será la probabilidad de estar frente a una contaminación reciente. Ahora bien la determinación de estos indicadores se efectúa a través del método de NMP establecido en la Norma Venezolana COVENIN 1104-96, en donde básicamente se describe el procedimiento a seguir para la obtención de resultados referente a lo que se busca, para finalmente evaluar la calidad sanitaria de muestras de agua.

III. FUNDAMENTO TEÓRICO

Los coliformes totales comprenden a todos los bacilos gram-negativos (Figura 18), aerobios o anaerobios facultativos, no esporulados, que fermentan la lactosa con producción de gas en un lapso máximo de $48\text{ h} \pm 2\text{ h}$ a $35^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$. Este grupo está conformado por 4 géneros principalmente: *Enterobacter*, *Escherichia*, *Citrobacter* y *Klebsiella*. (DISA C.A., 2015)



Ese grupo de bacterias ha sido elegido como indicador de contaminación del agua debido a los siguientes factores:

- a. Están presentes en el excremento de animales de sangre caliente, incluso de los seres humanos;
- b. Son de fácil detección y cuantificación por medio de técnicas sencillas y económicamente viables, en cualquier tipo de agua;
- c. Su concentración en el agua contaminada está directamente relacionada al gradiente de contaminación fecal;
- d. el tiempo de sobrevivencia en el agua es mayor que las bacterias patogénicas intestinales, por ser menos exigentes en términos nutricionales, además de ser incapaces de multiplicarse en ambiente acuático o multiplicarse menos que las bacterias entéricas;
- e. Son más resistentes a los agentes tenso activos y agentes desinfectantes que a las bacterias patogénicas. (Ministerio de Salud, 2013)

Por otra parte existen diversos métodos para cuantificar el número de microorganismos presentes en muestras líquidas y sólidas. Cabe destacar que en la mayoría de los laboratorios el método más utilizado es el Numero Más Probable de Bacterias Coliformes regido por la Norma Venezolana COVENIN 1104-96.

La determinación del NMP de bacterias Coliformes en una muestra se hace a partir de la técnica de fermentación de tubos múltiples, en la cual volúmenes decrecientes de la muestra (diluciones decimales consecutivas) son inoculadas en un medio de cultivo adecuado.

El método consta de dos etapas: prueba presuntiva y prueba confirmativa. La prueba presuntiva consiste en colocar volúmenes determinados de una muestra en una serie de tubos conteniendo caldo laurilo triptosa y son incubados a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ entre 24h a $48\text{h} \pm 2\text{h}$.

En esta prueba presuntiva (Figura 19) la actividad metabólica de las bacterias es estimulada vigorosamente y ocurre una selección inicial de organismos que fermentan la lactosa con producción de gas. La formación de gas a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ dentro de las 24h a $48\text{h} \pm 2\text{h}$, constituye una prueba presuntiva positiva para la presencia de bacterias del grupo Coliforme.



Figura 19. **Prueba presuntiva positiva.** Nota. Herrera y Pedroza (2016)



Figura 20. **Prueba confirmativa.** Nota. Herrera y Pedroza (2016)

La prueba confirmativa consiste en transferir todos los tubos de la prueba presuntiva a tubos que contiene caldo lactosado verde brillante bilis, en donde son incubados de $24\text{h} \pm 2\text{h}$ más, a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Esta prueba reduce la posibilidad de resultados falsos gas positivos que pueden ocurrir por la actividad metabólica de los organismos formadores de esporas o por la producción de gas debido a que algunas cepas bacterianas no pueden, individualmente producirlo a partir de la fermentación de la lactosa. El caldo de lactosa verde brillante bilis contiene agentes selectivos e inhibidores que suprimen el desarrollo de todos los organismos no coliforme de gas a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, la producción de turbidez constituye una prueba confirmativa positiva (Figura 20). Se observa del lado derecho la producción de gas, arrojando una confirmación de la presencia de

coliforme totales, mientras que del lado izquierdo no presenta ninguna característica, es decir no hay presencia de los mismos.

Al confirmar que en efecto hay presencia de bacterias Coliformes se determinará el NMP' a través de la Tabla 11.

Tabla 11
NMP y límite de confianza del 95% entre los cuales puede variar para las diversas combinaciones de resultados positivos, obtenido de tres porciones (10, 1, 0,1).

COMBINACION DE TUBOS POSITIVOS	NMP	Límite de confianza del 95%	
		Límite Inferior	Límite Superior
0-0-0	< 3		
0-0-1	3	< 0.5	9
0-1-0	3	< 0.5	13
0-2-0	-		
1-0-0	4	< 0.5	20
1-0-1	7	1	21
1-1-0	7	1	23
1-1-1	11	3	36
1-2-0	11	3	36
2-0-0	9	1	36
2-0-1	14	3	37
2-1-0	15	3	44
2-1-1	20	7	89
2-2-0	21	4	47
2-2-1	28	10	150
2-3-0	-		
3-0-0	23	4	120
3-0-1	39	7	130
3-0-2	64	15	380
3-1-0	43	7	210
3-1-1	75	14	230
3-1-2	120	30	380
3-2-0	93	15	380
3-2-1	150	30	440
3-2-2	210	35	470
3-3-0	240	36	1,300
3-3-1	460	71	2,400
3-3-2	1,100	150	4,800
3-3-3	2,400		

Nota. Norma Venezolana COVENIN 1104-96.

Luego se tiene que cuantificar la cantidad existente en una muestra de 100 ml con la siguiente fórmula:

$$\frac{NMP}{100ml} = NMP * \frac{10}{menor\ division} \quad (I)$$

Donde:

NMP': Número más probable (NMP/ 100 ml)

Menor división: es el menor volumen de la muestra positiva

Cabe destacar que se puede presentar los siguientes casos:

- a) Si en la prueba presuntiva arroja negativo significa que la presencia de coliforme en una muestra de agua por cada 100 ml es menos 1,8 NMP, por lo tanto es salubre.
- b) Si es igual a 1,8 deben realizarle un tratamiento mínimo.
- c) Si se presenta el caso confirmado que todos los arrojan positivo el NMP es mayor a 1600 en una muestra de 100 ml, el agua es insalubre completamente.

Ejemplo de cálculo:

Tres porciones 10 ml resultaron positivas, dos de 1 ml y ninguno 0,1 ml. El código resultante será 3-2-0, se localiza el valor en la tabla, y se obtiene el valor del NMP ajustando las diluciones de acuerdo a la formula

$$\frac{NMP}{100ml} = NMP * \frac{10}{menor\ division}$$

$$\frac{NMP}{100ml} = 93 * \frac{10}{1} = 930\ NMP/100ml$$

IV. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

1. Material

Mechero	Lentes de seguridad
Guantes	15 Tubos de ensayo (16 X 150)
Propipeta	Matraz volumétrico de 500 ml
Micropipeta	Cilindro graduado de 500 ml
2 Gradillas	Boquilla para pipeta de 10, 1,0.1 ml
Aza de platino	15 Tubos Durham

2. Equipos

Nevera
Balanza
Incubadora
Autoclave
Agitador magnético
Campana con luz ultravioleta

3. Reactivos

Agua destilada
Alcohol isopropílico
Caldo Lauril Sulfato
Caldo Bilis Verde Brillante 2%

V. DESARROLLO EXPERIMENTAL

a. Instrucciones generales

Traer una muestra representativa del agua que se quiere ensayar.

1. Se lavan 15 tubos de ensayo con agua y jabón, los cuales, se dividirán en partes iguales para colocar la muestra en porciones de 10 ml, 1 ml y 0,1 ml.
2. Se identifica cada tubo de ensayo colocando las iniciales del tipo de prueba (CT), código de la muestra (001), y volumen de muestra que se sembrará (10 ml, 1 ml, 0,1 ml).

b. Prueba presuntiva

Para la realización del medio de cultivo:

3. Se lavan 15 tubos de ensayo con agua y jabón, los cuales, se dividirán en partes iguales para colocar la muestra en porciones de 10 ml, 1 ml y 0,1 ml.
4. Se identifica cada tubo de ensayo colocando las iniciales del tipo de prueba (CT), código de la muestra (001), y volumen de muestra que se sembrará (10 ml, 1 ml, 0,1 ml).
5. Con un cilindro graduado medir 150 ml de agua destilada (por cada tubo de ensayo son 10 ml de agua destilada).
6. Se mide en una balanza los gramos requeridos de Caldo de Lauril Sulfato. Cabe destacar que para un litro de agua destilada se utiliza 35,6 gramos de este nutriente, tomando en cuenta que son 150 ml, solo corresponde 5,34 gramos de Laurilo Sulfato.

Ejemplo:

1000 ml de agua destilada → 35,6 g

150 ml de agua destilada → X g

$$X = 5,34 \text{ g}$$

7. En un matraz volumétrico se colocan los 150 ml de agua destilada y los 5,34 gramos de nutriente, con la ayuda de un agitador magnético se excita el medio hasta que esté completamente disuelto y tenga un color amarillo pálido.
8. Una vez listo el medio de cultivo con una propipeta, se toma 10 ml de medio de cultivo y se coloca en cada tubo de ensayo, luego se le adiciona el tubo Durham invertido, se cierra el tubo de ensayo y se agita de arriba hacia abajo, con la finalidad que no quede aire atrapado en el tubo Durham y arroje un falso positivo.
9. Los tubos de ensayo se deben llevar al autoclave, para esterilizar tanto el tubo como el medio de cultivo, donde estarán bajo 15 libras de presión, equivalente a 212 °C.
10. Una vez esterilizados se toman los tubos y se llevan a la nevera para enfriar el medio.

Siembra de la muestra:

11. Se coloca a calentar la campana con luz ultravioleta (más o menos 10 minutos).
12. Se desinfectan las manos con alcohol isopropílico, se colocan los guantes mascarillas y lentes, para evitar en ambos sentido contaminación.
13. Se coloca el recipiente con la muestra y los tubos de ensayo con el medio de cultivo dentro de la campana, luego con la ayuda de una micropipeta y una boquilla de 10 ml se toma la muestra, para colocarla por un borde de tubo de ensayo de manera delicada, con la finalidad de no matar a los Coliformes, de la misma manera se efectúa para un 1 ml, y para 0.1 ml, con 5 repeticiones cada una.
14. Luego se llevan a incubar a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por $24\text{h} \pm 2\text{h}$, si en ese lapso no presencia de gas en el tubo Durham o turbidez, se dejan incubando por 24 horas más.

Nota: la formación de gas dentro de las $48h \pm 2h$, constituye una prueba presuntiva positiva y da un indicio de la presencia de Coliformes.

c. Prueba confirmativa

Para la realización del medio de cultivo:

15. Se realizan los mismos pasos que en la prueba presuntiva solo que el medio será caldo Verde Brillante Bilis, y solo serán tres tubos de ensayo con el medio, pues se tomara solo uno de cada porción que haya arrojado positivo. Cabe destacar que por cada litro de agua destilada son 40 gramos del nutriente.

Siembra de la muestra:

16. Dentro de la campana, se esteriliza el aza de platino con un mechero, se deja enfriar, luego se sumerge en el tubo de ensayo que arrojó positivo en la prueba presuntiva, se agita para agarrar una burbuja que será llevada al nuevo medio, esto se hará solo una de cada porción que sea positivo.
17. Luego se llevan a incubar a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por $24h \pm 2h$, si en ese lapso no presencia de gas en el tubo Durham o turbidez, se dejan incubando por 24 horas más.

Nota: la formación de gas dentro de las $48h \pm 2h$, constituye la confirmación de la presencia de coliformes, y una vez obtenido esto se realizan los cálculos pertinentes.

d. Resultados

1. Anotar en una tabla los resultados obtenidos.
2. Analizar los resultados obtenidos al compararlos con la normativa legal vigente.

e. Cuestionario

1. ¿Cuál es la importancia de la práctica de Coliforme Totales?
2. ¿Cómo se debe realizar el análisis de los resultados obtenidos con respecto a la norma vigente?

Bibliografía

DISA C.A. (2015). *MANUAL DE BACTERIOLOGIA. Analisis de aguas y aguas de desecho*. Valencia.

Division de Salud Pública Carolina del Norte. (Septiembre de 2009). *North Carolina Public Health*. Recuperado el 22 de Septiembre de 2016, de http://epi.publichealth.nc.gov/oeo/docs/Las_Bacterias_Coliformes_WellWater_FactSt.pdf

Ministerio de Salud. (2013). *Manual Práctico de Análisis de Agua*. Brasilia.

Norma Venezolana COVENIN 1104-96. (1996). *Determinacion del Número Más Probable de Coliformes, Coliformes Fecales y Escherichia Coli*. Caracas: Fondorama.

PRÁCTICA 2

COLIFORME FECALES

I. OBJETIVOS GENERALES

1. Conocer el método para la determinación de organismos Coliformes Fecales en muestra de agua.
2. Aplicar el procedimiento para la determinación de organismos Coliformes Fecales en muestras de agua.
3. Analizar conclusiones y recomendaciones, realizando una comparación entre la norma legal vigente y los resultados generados en el laboratorio.

II. INTRODUCCIÓN

Aproximadamente el 95% del grupo de los Coliformes presentes en heces están formados por *Escherichia coli* y ciertas especies de *Klebsiella*. Ya que los Coliformes Fecales se encuentran casi exclusivamente en las heces de los animales de sangre caliente, se considera que reflejan mejor la presencia de contaminación fecal. Estos últimos se denominan termotolerantes por su capacidad de soportar temperaturas más elevadas, característica que diferencia a Coliformes Totales de los Fecales (Aycachi, 2008). Cabe destacar que existen diversos métodos para cuantificar el número de microorganismos presentes en muestras líquidas y sólidas. Dentro de las técnicas más comunes se encuentra el recuento directo por microscopía de fluorescencia, así como los procedimientos basados en diluciones en serie, haciendo crecer microorganismos en medios de cultivo sintéticos, sólidos o líquidos, como el recuento en placa de unidades formadoras de colonias o la estimación por el método del Número Más Probable (NMP), establecido por el Métodos Estándar para el Examen del Agua y Aguas Residuales.

III. FUNDAMENTO TEÓRICO

Las bacterias Coliformes fecales forman parte del total del grupo coliforme. Éstas son definidas como bacilos gram-negativos, no esporulados que fermentan la lactosa con producción de ácido y gas a $45^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ entre las 24 a $48\text{h} \pm 2\text{h}$. La mayor especie en el grupo de coliforme fecal es la *Escherichia coli*. (DISA C.A., 2015)

Ventajas como indicador:

- La mayoría crece en altas temperaturas.
- Su presencia indica contaminación fecal.
- La supervivencia del grupo Coliforme fecal es corta en medio acuoso comparada con la de otros grupos Coliformes, por lo tanto su presencia indica contaminación reciente.

Técnica para identificar los Coliformes fecales

Consiste en sembrar en capsulas de petri con desoxicolato-citrato-agar, las diluciones deseadas de las muestra, se incuban a $45^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ por $24\text{h} \pm 2\text{h}$. Cabe destacar que se considera positiva la prueba si hay presencia de colonias de color característico, según la especie de bacilo entéricos presentes (Figura 21 y Figura 22).



Figura 21. **Escherichia de color rojo.** Nota. Armora y Gómez (2012)

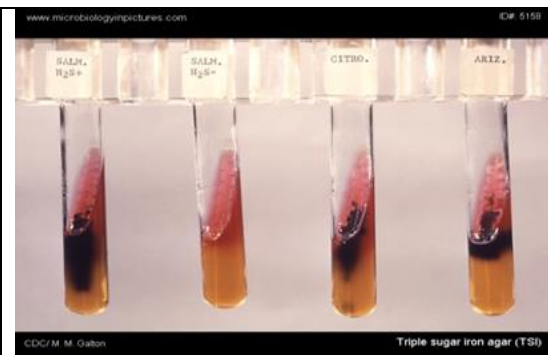


Figura 22. **Citrobacter y Arizona de color rosa o rojo con centro negro.** Nota. Armora y Gómez (2012)

IV. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

1. Material

Mechero	15 Tubos Durham
Guantes	Lentes de seguridad
Propipeta	15 Tubos de ensayo (16 X 150)
Micropipeta	Matraz volumétrico de 500 ml
2 Gradillas	Cilindro graduado de 500 ml
Capsulas de Petri	Boquilla para pipeta de 10, 1,0.1 ml
Aza de platino	

2. Equipos

Nevera
Balanza
Incubadora
Autoclave
Agitador magnético
Campana con luz ultravioleta

3. Reactivos

Agua destilada
Alcohol isopropílico
Caldo Lauril Sulfato
Mac Conkey Agar

V. DESARROLLO EXPERIMENTAL

a. Prueba presuntiva

Para la realización del medio de cultivo y siembra:

Se realiza el mismo procedimiento que se efectuó en Coliformes totales, lo único diferente será que se incubará a $45^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$.

b. Prueba confirmativa

1. En la cápsula de petri se coloca el nutriente el cual será Mac Conkey-Agar, el mismo se prepara igual que los anteriores y en la misma proporción, se debe tomar en cuenta que por cada litro de agua destilada equivale a 50 gramos de nutriente.
2. Se lleva a la autoclave para esterilizarlos.
3. Dentro de la campana, con ayuda del asa de platino ya esterilizada se toma una burbuja de los tubos que arrojaron positivos y se coloca en el medio de cultivo tibio en forma de sisa de manera muy delicada para que no se rompa el folículo de las bacterias, se tapa la capsula y se lleva a incubar de 24h a $48\text{h} \pm 2\text{h}$ a $44^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$. Luego se debe determinar el NMP por cada 100 ml como se determinó en la práctica 1.

Nota: pasadas las 48 horas la muestra toma un color rojizo morado quiere decir que hay presencia de coliformes fecales (Figura 23).

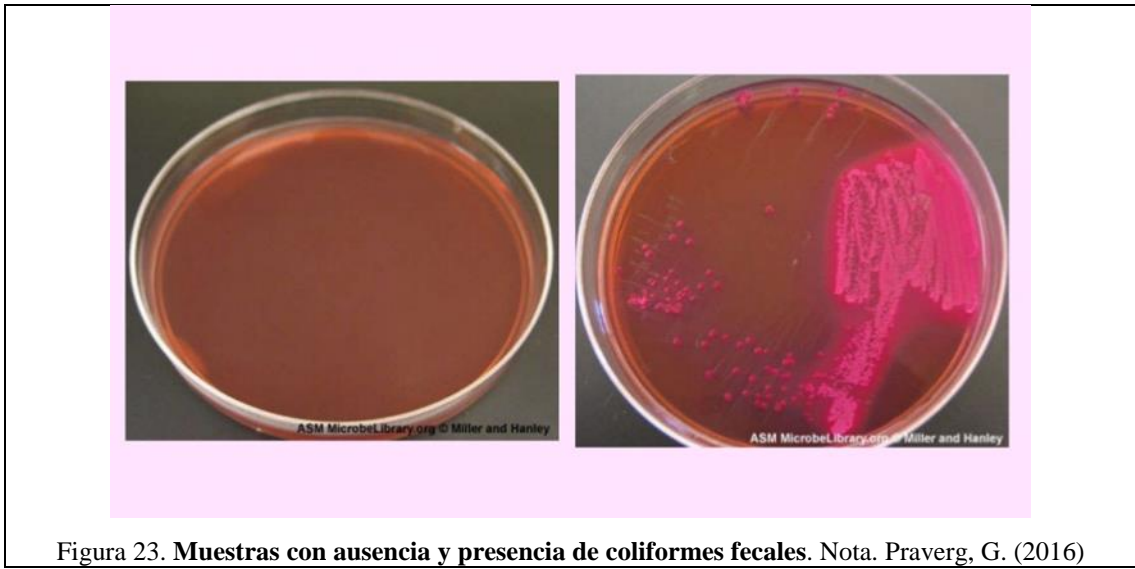


Figura 23. Muestras con ausencia y presencia de coliformes fecales. Nota. Praver, G. (2016)

c. Resultados

1. Anotar en una tabla los resultados obtenidos.
2. Analizar los resultados obtenidos al compararlos con la normativa legal vigente.

d. Cuestionario

1. ¿Cuál es la diferencia entre Coliformes totales y fecales?
2. ¿Cómo se debe realizar el análisis de los resultados obtenidos con respecto a la norma vigente?

Bibliografía

- Aycachi, R. (2008). *Monografias.com*. Recuperado el 26 de Septiembre de 2016, de <http://www.monografias.com/trabajos89/determinacion-coliformes-totales-fecales/determinacion-coliformes-totales-fecales.shtml>
- DISA C.A. (2015). *MANUAL DE BACTERIOLOGIA. Analisis de aguas y aguas de desecho*. Valencia.

Norma Venezolana COVENIN 1104-96. (1996). *Determinacion del Número Más Probable de Coliformes, Coliformes Fecales y Escherichia Coli*. Caracas: Fondorama.

PRÁCTICA 3

PSEUDOMONAS AERUGINOSA

I. OBJETIVOS

1. Conocer el método empleado para determinación de pseudomonas aeruginosa.
2. Aplicar el procedimiento para la determinación de pseudomonas aeruginosa en una muestra de agua.
3. Elaborar conclusiones y recomendaciones realizando una comparación entre los resultados obtenidos con el valor máximo permitido establecido en la normativa legal vigente.

II. INTRODUCCIÓN

El agua es un recurso indispensable para la vida; por tal motivo, su sistema de tratamiento debe ser evaluado y controlado periódicamente, para garantizar la calidad de la misma. El agua no debe presentar ningún tipo de irritación química, intoxicación o infección microbiológica que sea perjudicial a la salud humana. (Marchand, 2002)

En este sentido, conocer la calidad microbiológica del agua es de gran importancia, dado que hay el riesgo de consumirla contaminada con bacterias patógenas provenientes de heces fecales de humanos y animales, además de factores fisicoquímicos y ambientales.

Las pseudomonas aeruginosa son bacterias patógenas oportunistas y evidentemente la presencia de las mismas en el agua potable es un problema latente en la población debido a que pueden causar múltiples enfermedades, siendo los más afectados los inmunodeficientes, recién nacidos y personas de la tercera edad. Estas bacterias son capaces de inhibir los coliformes, los cuales son considerados los

indicadores de contaminación de agua más usados en el mundo. Por esta razón, Robertson y Tobin (1983), al evaluar *Pseudomonas aeruginosa*, concluyeron que es un indicador complementario a coliformes totales y fecales en aguas. (Citado por Marchand, 2002).

Si bien la búsqueda directa de bacterias patógenas específicas no forma parte de los exámenes bacteriológicos habituales a los que se someten las muestras de agua, habrá casos en que será necesario efectuar exámenes para la determinación de gérmenes patógenos intestinales. Ahora bien la determinación de este indicador se realizará por el método del número más probable según lo establecido en la Norma Venezolana COVENIN 2986-93, en donde se describe el procedimiento a seguir.

III. FUNDAMENTO TEÓRICO

Las *pseudomonas aeruginosa* pertenecen a la familia Pseudomonadaceae y es un bacilo gramnegativo aerobio con un flagelo polar. Cuando se cultiva en medios adecuados produce piocianina, un pigmento azulado no fluorescente. Muchas cepas producen también el pigmento verde fluorescente pioverdina (Figura 24). Las *pseudomonas aeruginosa*, al igual que otras *pseudomonas* fluorescentes, produce catalasa y oxidasa, así como amoniaco a partir de la arginina, y puede utilizar citrato como única fuente de carbono. (Prescott y otros, 2002)



Figura 24. *Pseudomonas aeruginosa*. Nota. Microbe World. (2015)

La *Pseudomonas aeruginosa*, es una bacteria flagelada con forma de bastoncillo, que produce pigmentos fluorescentes de colores que pueden variar desde el rojo hasta el negro. Es una bacteria muy extendida, y puede encontrarse en el agua, la tierra, animales o plantas, ya que sus necesidades alimenticias son mínimas, aunque las enfermedades producidas por esta bacteria están asociadas a su preferencia por los medios húmedos (Tapia, 2006); así como también es considerada uno de los contaminantes más comunes en las fuentes de suministro de agua. Es capaz de multiplicar ya que puede proliferar gracias a la gran variedad de compuestos orgánicos que utilizan como fuentes de carbono y energía.

La importancia de *Pseudomonas* se tornó mayor cuando se comprobó su capacidad de inhibir los coliformes, siendo los indicadores de contaminación de agua más usados en el mundo, se corre un gran riesgo de consumir agua con índice de coliformes cero los cuales podrían estar inhibidos por *Pseudomonas* (Marchand, 2002); por lo que se considera que aun cuando las aguas tratadas muestren estar libres de coliformes no se puede asegurar su potabilidad.

Existen diversos métodos para determinar la presencia de *Pseudomonas aeruginosa* en muestras líquidas, pero en este caso se tomará en cuenta el Método del Número más Probable (NMP) a través de la técnica de tubos múltiples, regidos por lo establecido en la Norma Venezolana COVENIN 2986-93.

El método consiste en inocular volúmenes conocidos de una muestra de agua en cinco (5) tubos de ensayo, con un medio de cultivo no selectivo en doble concentración. Después del periodo de incubación se observan los tubos que presentan un pigmento fluorescente verde, se confirman en un medio selectivo y finalmente se obtienen el NMP de *Pseudomonas aeruginosa* utilizando las tablas para tal fin.

IV. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

1. Material

Cilindro graduado 100 ml	Tubos de ensayos 150 x 15 mm
Piseta	Pipeta de 50 ml
Matraz Erlenmeyer de 500 ml	Propipeta
Gradilla	Capsula de Petri
Mechero	Asa de platino
Guantes	Lentes de seguridad
Micropipeta	

2. Equipos

Balanza	Incubadora
Agitador metálico	Asa de platino
Autoclave	Campana con luz ultravioleta

3. Reactivos

Caldo Lauril Sulfato
Cetrimide Agar

V. DESARROLLO EXPERIMENTAL

a. Instrucciones generales

Traer una muestra representativa del agua que se quiere ensayar.

1. Se lavan cinco (5) tubos de ensayo y se colocan en la gradilla.

Nota: la cantidad de tubos de ensayos dependerá de la cantidad de puntos de captación de donde se recolectó la muestra, es decir, por cada punto de captación son cinco (5) tubos de ensayos.

2. Se identifica cada tubo de ensayo colocando las iniciales del tipo de prueba (SA), código de la muestra (001) y volumen de muestra que se sembrará (10 ml).

b. Prueba presuntiva

Para la realización del medio de cultivo:

3. Con un cilindro graduado medir 50 ml de agua destilada (por cada tubo de ensayo son 10 ml de agua destilada).
4. Se mide en una balanza los gramos requeridos de sulfato de laurilo en doble concentración. Se debe destacar que para un litro de agua destilada se utiliza 35,6 gramos de este nutriente.
5. En un matraz volumétrico se coloca los 50 ml de agua destilada y los gramos de nutriente, con la ayuda de un agitador magnético se agita el medio hasta que esté completamente disuelto.
6. Con una propipeta, se toma 10 ml de medio de cultivo y se coloca en cada tubo de ensayo (Figura 25).



Figura 25. Medio de cultivo en tubos de ensayo. Nota. Herrera D., Pedroza J. (2016)

7. Los tubos de ensayo se deben llevar al autoclave, para esterilizar tanto el tubo como el medio de cultivo a 215° C durante 15 minutos.
8. Una vez esterilizados se toman los tubos y se llevan a la nevera para enfriar el medio.
9. Se procede a sembrar la muestra y principalmente se coloca a calentar la campana con luz ultravioleta durante 10 minutos.
10. Se desinfectan las manos con alcohol isopropílico, se colocan los guantes mascarillas y lentes, para evitar en ambos sentido contaminación.
11. Se coloca el recipiente con la muestra y los tubos de ensayo con el medio de cultivo dentro de la campana, luego con la ayuda de una micropipeta y una boquilla de 10 ml se toma la muestra, para colocarla por un borde del tubo de ensayo de manera delicada. Esto mismo se hace con el resto de los tubos de ensayo.
12. Se incuban de 35° C a 37° C por 24 horas. después de este tiempo, examine los tubos con la lámpara ultravioleta, si no observa la aparición de un pigmento fluorescente verde se dejan incubando por 24 horas más.

Nota: Se consideran como tubos positivos en la prueba presuntiva, aquellos que presenten fluorescencia verde después del periodo de incubación. Esto da un indicio de la presencia de pseudomonas.

c. Prueba confirmativa

Para la realización del medio de cultivo:

13. Se realizan los mismos pasos que en la prueba presuntiva solo que el medio será Agar acetamida y se tomarán los tubos positivos de la prueba anterior. Cabe destacar que por cada litro de agua destilada son 10 gramos del nutriente.
14. Para sembrar la muestra primero se debe esterilizar el asa de platino con un mechero dentro de la campana con luz ultravioleta, se deja enfriar, luego se sumerge en el tubo de ensayo que arrojó positivo en la prueba presuntiva, se

agita para agarrar una burbuja que será colocada sobre la capsula de petri que contiene agar acetamida.

15. Se incuban de 35° C a 37° C por 24 horas. Si en ese tiempo no hay presencia de pigmentos fluorescentes verdes se dejan incubando por 24 horas más.

16. Finalizado el periodo de incubación se consideran como positivos en la prueba confirmativa aquellas capsulas de Petri donde se observa la aparición de pigmentos verdes fluorescentes (Figura 26).

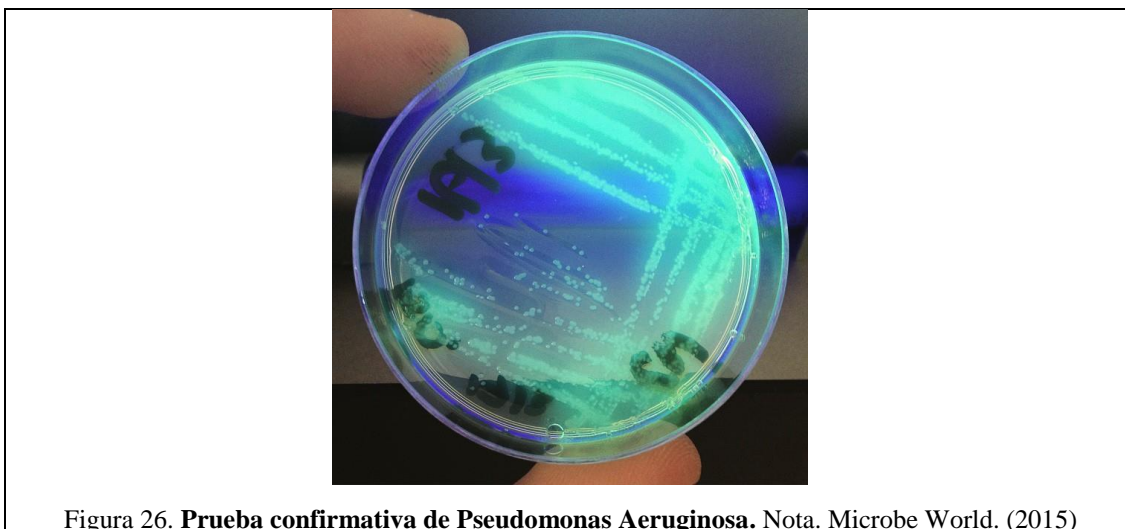


Figura 26. Prueba confirmativa de *Pseudomonas Aeruginosa*. Nota. Microbe World. (2015)

17. Se cuenta el número de capsulas positivas obtenidas y se determina el NMP de *Pseudomonas aeruginosa* por medio de la Tabla 12.

Tabla 12

Índices de NMP y límites de confianza de 95% para varias combinaciones de resultados positivos y negativos.

No. de tubos positivos	Indice NMP/100ml	Límites de Confianza de 95%	
		Inferior	Superior
0	≤ 2,2	0	6
1	2,2	0,1	12,6
2	5,1	0,5	19,2
3	9,2	1,6	29,4
4	16	3,3	52,9
5	≥ 16	8	Infinito

Nota. Norma Venezolana COVENIN 2986-93.

d. Resultados

1. Apuntar los resultados obtenidos.
2. Analizar los resultados y compararlos con lo establecido en la normativa legal vigente. Emitir conclusiones.

e. Cuestionario

1. ¿Qué importancia tiene la práctica de pseudomonas aeruginosas?
2. ¿Cuáles son las enfermedades más comunes causadas por la presencia de pseudomonas aeruginosas en el agua para consumo humano?
3. ¿Consideras que es importante saber interpretar los resultados de este ensayo y compararlos con los valores que establece la normativa legal vigente? ¿Por qué?

Bibliografía

DISA C.A. (2015). *MANUAL DE BACTERIOLOGIA. Analisis de aguas y aguas de desecho*. Valencia.

Marchand, E. (2002). *MICROORGANISMOS INDICADORES DE LA CALIDAD DEL AGUA DE CONSUMO HUMANO EN LIMA METROPOLITANA*. Lima.

Norma Venezolana COVENIN 2986-93. (1993). *Agua Potable. Determinacion de Pseudomonas Aeruginosas por el Método del Número Más Probable*. Caracas: Fondorama.

Prescott, L., Harley, J., & Klein, D. (2015). *Microbiología*. Madrid: McGraw-Hill - INTERAMERICANA DE ESPAÑA, S.A.U.

Tapia, C. (19 de Junio de 2006). *Pseudomona Aeruginosa*. Recuperado el 29 de Octubre de 2016, de <http://pseudomonaeruginosa.blogspot.com/>

ANEXO A

TÉRMINOS BÁSICOS

Aguas residuales: Las aguas residuales son cualquier tipo de agua cuya calidad se vio afectada negativamente por influencia antropogénica. Las aguas residuales incluyen las aguas usadas domésticas y urbanas, y los residuos líquidos industriales o mineros eliminados, o las aguas que se mezclaron con las anteriores (aguas pluviales o naturales).

Bacteria: Se trata de un microorganismo unicelular procarionte que puede provocar enfermedades, fermentaciones o putrefacción en los seres vivos o materias orgánicas. Por tratarse de células procariotas, carecen de núcleo u orgánulos internos.

Microorganismos: es un ser vivo, o un sistema biológico, que solo puede visualizarse con el microscopio.

Coliformes totales: Son bacilos cortos, no esporulados aerobios y anaerobios facultativos, gram negativos, que fermentan la lactosa con producción de gas y acidez en un periodo de 48 horas a 35 °C.

Coliformes fecales: Son bacilos cortos gram negativos, no esporulados que fermentan la lactosa con producción de gas y acidez en periodos de 24 a 48 horas a temperaturas entre 35 °C y 44.5 °C.

Pseudomonas: Las pseudomonas constituyen un género específico de los bacilos, formado por bacterias oxidasa positivas (es decir, que producen esta enzima) y gram negativas (ya que no adquieren una tonalidad azulada cuando se les aplica la coloración de gram).

Muestra: Parte o cantidad pequeña de una cosa que se considera representativa del total y que se toma o se separa de ella con ciertos métodos para someterla a estudio, análisis o experimentación.

Esterilización: Se denomina esterilización al proceso por el cual se obtiene un producto libre de microorganismos vivos. El proceso de esterilización debe ser diseñado, validado y llevado a cabo para asegurar que es capaz de eliminar la carga microbiana del producto o un microorganismo más resistente.

Reactivos: Sustancia que, por su capacidad de provocar determinadas reacciones, sirve en los ensayos y análisis químicos para revelar la presencia o medir la cantidad de otra sustancia.

Fermentación: modificación de compuestos químicos por microorganismos en crecimiento. Crecimiento bacteriano en sí cuando el interés del cultivo es la producción de biomasa.

Inocular: se refiere a la incorporación de una sustancia en un organismo.

Incubar: Desarrollar el organismo.

Autoclave: es un recipiente de presión metálico de paredes gruesas con un cierre hermético que permite trabajar a alta presión para realizar una reacción industrial, una cocción o una esterilización con vapor de agua.

Asa de platino: es un instrumento de laboratorio que consta de una base que puede estar hecha de platino, acero, aluminio y un filamento que puede ser de nicromo, tungsteno o platino que termina o en un arito de 5 mm o en punta.

Se emplea para transportar o arrastrar o trasvasar inóculos (pequeño volumen que contiene microorganismos en suspensión) desde la solución de trabajo también llamada “solución madre” al medio de cultivo (sólido o líquido) o de un medio a otro (resiembra). También sirve para la realización de frotis.

La cantidad de inóculo que se trasvasa viene determinado por el diámetro del aro final del filamento, que se encuentra calibrado y normalmente oscila entre 0,01 y 0,001 ml.

Cultivo: En biología, bacteriología y específicamente en microbiología, un cultivo es un método para la multiplicación de microorganismos, tales como bacterias, hongos y parásitos, en el que se prepara un medio óptimo para favorecer el proceso deseado.

Agar: es un agente solidificante de medios de cultivo.

Agente Patógeno: Los patógenos son agentes infecciosos que pueden provocar enfermedades a su huésped. Este término se emplea normalmente para describir microorganismos como los virus, bacterias y hongos, entre otros.

Indicador: sustancia que se añade a una disolución para que manifieste, mediante un cambio de color, el punto en el que el soluto añadido ha reaccionado con todo el soluto presente en una disolución.

Bacilos gram-negativos: son células en forma de bastón alargado, que a su vez pueden tener varios aspectos: cilíndricos, fusiformes, en forma de maza, entre otros. Son aquellos que no fijan el violeta de genciana porque poseen la capa de lipopolisacárido (peptidoglicano).

Desinfección: Eliminación de agentes infecciosos que están fuera del organismo por medio de la exposición directa a agentes químicos o físicos.

CONCLUSIONES

1. Se determinó la necesidad de diseñar un manual de prácticas microbiológicas al agua para los alumnos de Ingeniería Civil de la Facultad de Ingeniería de la Universidad De Carabobo.
2. La elaboración de un manual de prácticas microbiológicas al agua, es factible técnicamente.
3. El manual de prácticas microbiológicas al agua, es una herramienta educativa importante para la ejecución de las prácticas.

RECOMENDACIONES

1. Revisión del manual anualmente para la actualización del mismo, tanto la parte técnica como la parte metodológica.
2. Realizar una evaluación técnica-económica, previa a la implementación del manual, de los equipos y materiales utilizados en cada práctica.
3. Aplicar el manual que se propone en la asignatura Laboratorio de Calidad Ambiental de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Carabobo, lo cual incrementaría el desarrollo del laboratorio a través de la expansión de los ensayos realizados.
4. Posibilidad de agregarle otros estudios al manual propuesto, como mohos y levaduras, salmonella y aerobios mesófilos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arias, F. (1999). *El Proyecto de Investigación*. Tercera Edición. Editorial Episteme. Caracas.
- Aycachi, R. (2008). *Monografias.com*. Recuperado el 26 de Septiembre de 2016, de <http://www.monografias.com/trabajos89/determinacion-coliformes-totales-fecales/determinacion-coliformes-totales-fecales.shtml>
- Callañaupa, D. (30 de Mayo de 2013). *Slide Share*. Recuperado el 14 de Agosto de 2016, de <http://es.slideshare.net/OverallhealthEnSalud/presentacion-recepcion-de-muestra-de-alimentos>
- Clesceri, L. (1999). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. American Public Health Association.
- Corral, Y. (2009). Validez y Confiabilidad de los Instrumentos de Investigación para la Recolección de Datos. Valencia. Obtenido de <http://servicio.bc.uc.edu.ve/educacion/revista/n33/art12.pdf>
- DISA C.A. (2015). *MANUAL DE BACTERIOLOGIA. Analisis de aguas y aguas de desecho*. Valencia.
- Division de Salud Pública Carolina del Norte. (Septiembre de 2009). *North Carolina Public Health*. Recuperado el 22 de Septiembre de 2016, de http://epi.publichealth.nc.gov/oeo/docs/Las_Bacterias_Coliformes_WellWater_FactSt.pdf

Farrás, R., & Solá, G. (s.f.). *Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo*. Recuperado el 27 de Octubre de 2016, de http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/NTP/Ficheros/401a500/ntp_432.pdf

Flores, D. (2012). *MANUAL DE ACTIVIDADES PRÁCTICAS A MICROESCALA PARA LOS LABORATORIOS DE QUÍMICA DE TERCER AÑO PARA EL MEJORAMIENTO DE LA CALIDAD AMBIENTAL EN LOS LICEOS DEL MUNICIPIO GUANARE*. Valencia.

López, D. (2016). *ELABORACIÓN DE UNA PROPUESTA PARA LA ENSEÑANZA EN EL LABORATORIO DE CALIDAD AMBIENTAL DE LA ESCUELA DE INGENIERÍA CIVIL, FACULTAD DE INGENIERÍA, UNIVERSIDAD DE CARABOBO*. Valencia.

Marchand, E. (2002). *MICROORGANISMOS INDICADORES DE LA CALIDAD DEL AGUA DE CONSUMO HUMANO EN LIMA METROPOLITANA*. Lima.

Mariñelarena, A. (2006). *Manual de autoconstrucción de sistemas de tratamiento de Aguas Residuales Domiciliarias*. Buenos Aires: FREPLATA.

Meda, R. (s.f.). *Britania Laboratorio S.A.* Recuperado el 18 de Agosto de 2016, de <http://www.britanialab.com/index.php>

Ministerio de Salud. (2013). *Manual Práctico de Análisis de Agua*. Brasilia.

Norma Venezolana COVENIN 2986-93. (1993). *Agua Potable. Determinación de Pseudomonas Aeruginosas por el Método del Número Más Probable*. Caracas: Fondorama.

Norma Venezolana COVENIN 2614-94. (1994). *Agua Potable. Toma de Muestra*. Caracas: Fondorama.

Norma Venezolana COVENIN 2709-02. (2002). *Aguas Naturales, Industriales y Residuales. Guía para las técnicas de muestreo*. Caracas: Fondorama.

Normal Venezolana COVENIN 1104-96. (1996). *Determinacion del Número Más Probable de Coliformes, Coliformes Fecales y Escherichia Coli*. Caracas: Fondorama.

Normas para la Clasificación y el Control de la Calidad de los Cuerpos de Agua y Vertidos o Efluentes Líquidos (*Decreto 883 del 11 de Octubre de 1995 publicado en Gaceta Oficial de la República de Venezuela N° 5.021 Extraordinario de fecha 18 de diciembre de 1995*). Caracas

Normas Sanitarias de Calidad del Agua Potable (*Ministerio de Sanidad y Asistencia Social, publicado en Gaceta Oficial de la República de Venezuela N° 36.395 Extraordinario de fecha 13 de febrero de 1998*). Caracas

ONU. (25 de Octubre de 2016). Obtenido de <https://www.un.org/es/events/waterday/>

Palella, S., & Martins, F. (2012). *Metodología de la Investigación Cuantitativa*. Caracas: FEDUPEL.

Prescott, L., Harley, J., & Klein, D. (2015). *Microbiología*. Madrid: McGraw-Hill - INTERAMERICANA DE ESPAÑA, S.A.U.

Rodier, J. (1990). *Analisis de las aguas*. Barcelona: Ediciones Omega, S.A.

Sanabria, J., & Acevedo, D. (2001). *Manual de Laboratorio Microbiología*. Cali.

Stanier, R., Adelberg, E., & Ingraham, J. (1986). *Microbiología*. Barcelona: Editorial Reverté, S.A.

Tamayo y Tamayo, M. (2003). *El Proceso de la Investigacion Cientifica*. Cuarta edicion. Editorial Limusa, S.A. Mexico, D.F.

Tapia, C. (19 de Junio de 2006). *Pseudomona Aeruginosa*. Recuperado el 29 de Octubre de 2016, de <http://pseudomonaeruginosa.blogspot.com/>

Thomas Scientific. (2016). Recuperado el 24 de noviembre de 2016, de <http://www.thomassci.com/>

ANEXO A

- PENSUM de Ingeniería Civil



PENSA DE ESTUDIOS						
Escuela de Ingeniería Civil						
PRIMER SEMESTRE						
CODIGO	ASIGNATURA	U.C.	hr	hp	hl	REQUISITOS
DH1B01	PROC. BASICOS DEL PENSAMIENTO	2	0	4	0	NINGUNO
HU1B01	INTROD. A LAS CIENCIAS HUMANAS	3	3	0	0	NINGUNO
MA1B01	ANALISIS MATEMATICO I	5	4	2	0	NINGUNO
MA1B02	GEOMETRIA ANALITICA	5	4	2	0	NINGUNO
SEGUNDO SEMESTRE						
CODIGO	ASIGNATURA	U.C.	hr	hp	hl	REQUISITOS
DE2B01	DEPORTE	0	0	2	0	12 UC
DH2B02	RAZ. VERBAL Y SOL DE PROBLEMAS	1.5	0	3	0	DH1B01
FI2B01	FISICA I	4	3	2	0	MA1B01+MA1B02
MA2B03	ANALISIS MATEMATICO II	4	3	2	0	MA1B01+MA1B02
MA2B04	ALGEBRA LINEAL	3.5	3	1	0	MA1B01+MA1B02
QM2B01	QUIMICA GENERAL I	3.5	3	1	0	7 UC
TERCER SEMESTRE						
CODIGO	ASIGNATURA	U.C.	hr	hp	hl	REQUISITOS
DH3B03	CREATIVIDAD E INVENTIVA	1.5	0	3	0	DH2B02+20 UC
DI3B01	DIBUJO I	2.5	1	3	0	DH2B02+MA1B02
FI3B02	FISICA II	3	2	2	0	FI2B01+MA2B03
FI3B03	LABORATORIO I DE FISICA	3	1	0	2	FI2B01
HU3B02	CULTURA	0	2	0	0	20 UC
MA3B05	FUNCIONES VECTORIALES	3.5	3	1	0	MA2B03+MA2B04
MA3B06	ECUACIONES DIFERENCIALES	3.5	3	1	0	MA2B03+MA2B04
QM3B02	QUIMICA GENERAL II	2.5	2	1	0	MA2B03+QM2B01
CUARTO SEMESTRE						
CODIGO	ASIGNATURA	U.C.	hr	hp	hl	REQUISITOS
CA4B01	COMPUTACION I	3	2	0	2	DH3B03+MA2B04
ID4B01	INGLES I	3	2	2	0	DH2B02+20 UC
IE4C01	MECANICA RACIONAL I	4.5	4	1	0	FI2B01+FI3B02+MA3B05
IN4C01	ESTADISTICA PARA ING. CIVIL	2.5	2	2	0	MA3B06
VI4C01	GEOMETRIA DESCRIPTIVA	3	2	2	0	DI3B01+CA4B01
QUINTO SEMESTRE						
CODIGO	ASIGNATURA	U.C.	hr	hp	hl	REQUISITOS
HU5B06	INTROD. AL SERVICIO COMUNITARIO	0	2	0	0	DE2B01+HU3B02+ID4B01+55 UC
IA5C01	MECANICA DE LOS FLUIDOS I	4.5	4	1	0	IE4C01+QM3B02+IE5C02
IE5C02	MECANICA RACIONAL II	3.5	3	1	0	IE4C01
IE5C03	RESISTENCIA DE MATERIALES	4	3	2	0	IE4C01+IE5C02
IE5C04	MATERIALES Y ENSAYOS	3.5	2	0	3	IN4C01+IE5C03
VI5C02	GEOLOGIA	3	2	2	0	CA4B01+VI4C01
SEXTO SEMESTRE						
CODIGO	ASIGNATURA	U.C.	hr	hp	hl	REQUISITOS
IA6C02	MECANICA DE LOS FLUIDOS II	4.5	3	1	2	IA5C01+IE5C03
IA6C03	HIGIENE Y SANEAMIENTO AMBIENTAL	3.5	3	1	0	IA5C01+QM3B02
IE6C05	INTRODUCCION AL ANALISIS EST	3.5	3	1	0	IE5C02+IE5C03
IE6C07	MECANICA DE LOS SUELOS	5	3	1	3	IE5C03+IE5C04+VI5C02
VI6C04	TOPOGRAFIA	5.5	4	0	3	VI5C02

SEPTIMO SEMESTRE						
CODIGO	ASIGNATURA	U.C.	ht	hp	hl	REQUISITOS
IA7C04	HIDROLOGIA	3.5	3	1	0	IA6C02+IE6C07
IA7C05	INSTALACIONES PARA EDIFICIOS	3	3	0	0	F13B02+IA6C02+IA6C03
IE7C06	CONCRETO ARMADO I	3.5	3	1	0	IE5C03+IE5C04+IE7C08
IE7C08	ESTRUCTURAS I	4.5	4	1	0	IE6C05
VI7C03	DIBUJO DE PROYECTOS	2	0	0	2	VI4C01+IA7C05+IE7C06
OCTAVO SEMESTRE						
CODIGO	ASIGNATURA	U.C.	ht	hp	hl	REQUISITOS
CO8B01	PROYECTO SERVICIO COMUNITARIO	0	0	0	0	HU5B06+120 UC
IA8C06	ACUEDUCTOS Y CLOACAS	4.5	3	3	0	IA7C04+IA7C05+VI6C04
IE8C09	CONCRETO ARMADO II	4.5	4	1	0	IE7C06
IE8C10	TECNICA DE LA CONSTRUCCION	2	1	2	0	IE7C06
IE8C11	ESTRUCTURAS II	4.5	4	1	0	IE7C08
IE8C12	FUNDACIONES Y MUROS	3.5	3	1	0	IE6C07+IE7C06
VI8C05	VIAS DE COMUNICACION I	3.5	2	1	2	VI6C04+VI7C03
NOVENO SEMESTRE						
CODIGO	ASIGNATURA	U.C.	ht	hp	hl	REQUISITOS
IA9C07	OBRAS HIDRAULICAS	5	4	2	0	IA7C04+IA8C06
IA9C08	INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	4	4	0	0	IA8C06
IA9C09	LABORATORIO DE CALIDAD AMBIENTAL	2	1	0	2	IA8C06+IA9C08
IE9C13	PROYECTOS ESTRUCTURALES CONCRE	4	3	2	0	IE8C09+IE8C11+IE8C12
PA9C01	PASANTIA CORTA	0	0	0	0	127 UC
TG9C01	TRABAJO ESPECIAL DE GRADO I	1.5	1	1	0	143 UC
VI9C06	VIAS DE COMUNICACION II	3	2	2	0	VI8C05
Asignaturas Electivas:						
CA9B02	COMPUTACION II	3	2	2	0	CA4B01
GE9C01	INGENIERIA ECONOMICA	3	3	0	0	EN4C01
IE9C14	ESTRUCTURAS AVANZADAS	3	2	2	0	IE8C11
QM9B03	LABORATORIO I DE QUIMICA	3	1	0	2	QM3B02
VI9C08	TRANSPORTE	3	2	2	0	VI8C05
VI9C09	AEROPUERTOS	3	2	2	0	VI8C05
DÉCIMO SEMESTRE						
CODIGO	ASIGNATURA	U.C.	ht	hp	hl	REQUISITOS
IE0C15	PROYECTOS ESTRUCTURALES ACERO	3.5	2	3	0	IE9C13
IE0C16	ADMINISTRACION DE OBRAS	4	4	0	0	IE9C13
IE0C18	DERECHO Y ETICA PARA ING. CIVIL	2	2	0	0	IE0C16
TG0C02	TRABAJO ESPECIAL DE GRADO II	5	0	0	0	TG9C01
VI0C07	PAVIMENTOS	5	3	1	3	VI9C06
Asignaturas Electivas:						
IA0C09	ECOLOGIA PARA INGENIEROS	3	3	0	0	IA8C06
IA0C10	BIOLOGIA Y MICROBIOLOGIA SANITARIA	2	2	1	0	IA8C06
IA0C11	TRATAMIENTO DE AGUA	2	4	0	0	IA8C06
IE0C17	PUENTES	3	2	2	0	IE8C12+IE9C13+VI9C06
IE0C19	CONCRETO PRETENSADO	3	2	2	0	IE8C09

Dirección de Asuntos Estudiantiles - Facultad de Ingeniería - Universidad de Carabobo

Figura 27. Pensum de Ingeniería Civil. Nota. www.dae.ing.uc.edu.ve

ANEXO B

- Contenido programático de la materia electiva Microbiología



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE INGENIERÍA
 VALENCIA - VENEZUELA
ESCUELA DE INGENIERÍA CIVIL

PROGRAMA SINÓPTICO						
DEPARTAMENTO Y/ O CÁTEDRA: <u>INGENIERÍA AMBIENTAL</u> REQUISITO:						
<u>IA8C06</u> FECHA: <u>2/2014</u> .						
ÁREA DE FORMACIÓN: <u>PROFESIONAL</u> CARÁCTER:						
<u>ELECTIVA</u> .						
CÓDIGO		ASIGNATURA				T
P	L	HT	UC			
<u>IA0C10</u>		<u>BIOLOGÍA Y MICROBIOLOGÍA SANITARIA</u>			<u>2</u>	<u>1</u>
					<u>0</u>	<u>3</u>
<u>2.0</u> .						
JUSTIFICACIÓN:						
Los futuros ingenieros deben tener los conocimientos básicos necesarios y suficientes de biología y microbiología general, que incluye información teórica, clara sobre bacterias, parásitos, hongos, algas, virus etc., que están en el medio y son capaces de afectarle y afectar todo lo que lo rodea, y a su vez de suministrarle las herramientas a utilizar en el futuro en la interpretación de un problema, sea éste de tipo experimental o de investigación del ambiente donde se vaya a desenvolver.						
OBJETIVOS GENERALES:						
Una vez terminado el curso, cada estudiante ha desarrollado las capacidades y destrezas necesarias y suficientes a manera de: Poseer los conocimientos necesarios para solucionar los problemas microbiológicos y sanitarios desde una complejidad sencilla, hasta moderadamente alta. Aplicar los conocimientos biológicos y microbiológicos de verdadero interés práctico para ejercer su profesión en las áreas de Higiene y Saneamiento Ambiental con bastante soltura y eficiencia. Utilizar las herramientas para diseñar y proyectar mejores y más prácticos sistemas de control de residuos líquidos, sólidos o gaseosos en el entorno, desde el punto de vista microbiológico. Conocer suficientemente el comportamiento de los microorganismos en los diversos tipos de ambientes, para una mejor toma de decisiones en un momento dado, cuando ésta sea requerida. Tener bases científicas concretas para realizar otros cursos, incluyendo cursos en el post-grado.						

CONTENIDOS:

I. Generalidades. Como aparece la vida, orígenes, historia, evolución. *Conceptos ecológicos:* Hábitat, nicho, biotopo, individuo, población, comunidad, biocenosis, bioma, ecosistema; características y leyes que la rigen; Antroposistema, características y relaciones diferenciales con el anterior. Relación del hombre con su medio. Definiciones de microbiología, su ámbito, divisiones. Evolución histórica de la biología y microbiología en Venezuela; sus representantes. Importancia de la Microbiología para el futuro profesional.

II. Microscopia y vida microscopia. Nociones sobre partes del microscopio, su manejo y aplicaciones. Conocimientos sobre la célula, definiciones, características, componentes celulares, función, tipo, clasificación, importancia. Seres vivos procariotas y eucariotas, generalidades. interés para el futuro profesional.

III. Bacterias. *Generalidades:* Procariotas, morfología, tamaño, fisiología, comportamiento, clasificación, nomenclatura. *Enterobacterias:* Definición, clasificación, comportamiento, interés para el futuro profesional de la ingeniería. *Ejemplos de bacterias de interés para la ingeniería:* Cólera, tifoidea, *scherichiae coli*; aerobacter; aerogenes; shigellas; salmonellas; proteus; tétano; etc.

IV. Parásitos. Hongos. Algas y líquenes. Generalidades. Morfología. Fisiología. Clasificación. Importancia médica y de ingeniería. *Ejemplos de parásitos de interés:* Amibas, tripanosomas, schizosomas, anquilostomideos, giardias, etc. *Ejemplos de hongos de verdadero interés:* Ficomicetos, ascomisetos, deuteromicetos, *Ejemplos de algas:* Cianofíceas. Clorofíceas. Feofíceas. Rodofíceas.

V. Virus y rickettsias. *Generalidades:* Naturaleza y origen. Características. Clasificación, comportamiento. Importancia e interés para el futuro ingeniero. *Ejemplo de virus:* Poliomielitis, rabia, hepatitis, dengue. *Ejemplo de Rickettsias:* Chlamidias, tífus, murino.

VI. Orígenes y destino de los microorganismos patógenos. Factores de supervivencia de bacterias y patógenos de las heces en el ambiente natural. *Ejemplo:* Vibrión cholera, salmonella tífus; amiba histolítica, ancylostoma duodenale. Virus y medio ambiente. Comportamiento de los patógenos en el suelo y en el agua.

VII. Microbiología del aire. *Microbiología industrial y de los alimentos:* Concepto de aerosoles, comportamiento de los microorganismos, tanto en ambientes cerrados como abiertos. *Microbiología industrial:* Alimentos (leche), conceptos sobre esterilización y pasteurización, apertización y congelamiento. Riesgos y preservación de alimentos. *Métodos de control de microorganismos:* Físicos, químicos y biológicos.

VIII. Microbiología del suelo y del agua. Generalidades, antecedentes históricos. Microorganismos del suelo, su comportamiento, ciclos entre el hombre, el medio y éstos. *Medidas de control: Biología del agua:* Aguas blancas, potables, residuales (componentes) aguas negras (componentes), fitoplancton, zooplancton. Factores de eutroficación de lagunas, embalses, etc.

IX. Calidad de las aguas. Clasificación general de las aguas blancas, negras, aguas naturales, residuales. Enfermedades transmitidas por el agua (hídricas), enfermedades bacterianas y parasitarias de contacto directo e indirecto respectivamente. Reducción de las enfermedades hídricas por el control de los microorganismos del agua. Parámetros o standards en aguas de piscinas, playas, balnearios, etc. *Distintos usos del agua:* Para irrigación, para bancos ostrícolas, aguas receptoras, etc.

X. Aguas blancas y aguas residuales. Análisis, muestreos, exploraciones; unidades de medidas. Indicadores de contaminación por microorganismos. Interpretación de los análisis.

XI. Mecanismos de disposición de aguas residuales. Prueba de percolación, séptico, pozo sumidero, letrina. Diferencia e importancia de cada uno de los anteriores. Tratamiento primario y secundario de líquidos residuales. Ciclo aeróbico y anaeróbico en microbiología acuática, DBO, DQO: Definición, características, objetivos e importancia. Sistemas de tratamiento aeróbico y anaeróbico. Lagunas de estabilización y Oxidación, filtros percoladores, zanjas filtrantes, lodos activados, plantas de tratamiento. Características, comportamiento e importancia.

XII. Desinfección de aguas. *Métodos físicos:* Radiaciones alfa, beta, gamma, ultravioleta. *Métodos químicos:* Halogenados, permanganato de potasio, plata, ozono y cloro. Historia, estudio y factibilidades actuales. Estudio de las normas sanitarias COVENIN, otras; análisis general y sanciones a ser aplicable. Políticas prevencionistas en Venezuela y otros países. Standards de control biológico.

ESTRATEGIAS DE ENSEÑANZA:

Explicación teórica. Exposiciones. Ejemplificación e ilustración

ANEXO C

- Entrevista con el Ing. Rafael Dautant



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA DE INGENIERÍA CIVIL
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA
AMBIENTAL



1. ¿Cuáles son los objetivos que debe cumplir un Ingeniero Civil en materia de ambiente?

R) Anteriormente y por tradición se les enseñaba a los estudiantes a ingeniárselas para resolver problemas en las construcciones de cualquier tipo sin tomar en cuenta los daños que iban a repercutir a su alrededor, sin embargo en la época moderna su visión cambió, ya que no es factible resolver un problema cuando se está generando otro al ambiente. Es por ello que la visión moderna abarca estos tres puntos fundamentales, lo que se está haciendo tenga un nivel importantísimo de justicia social, segundo que sea económicamente viable y tercero que sea ambientalmente seguro.

2. ¿Qué papel juega el componente ambiental en el perfil de un Ingeniero Civil?

R) Hoy por hoy todas las disciplinas de Ingeniería Civil deben tener como acompañamiento al medio ambiente lo que da un indicio del nivel de importancia que juega el ambiente en el perfil de un Ingeniero Civil.

3. ¿Qué importancia tienen los análisis para la determinación de la calidad del agua en la Ingeniería Civil?

R) Necesitamos saber, entender un poquito sobre calidad del agua y solo se logra efectuando los análisis apropiados; es por ello su valor, pues, no se pueden dejar de hacer.

4. ¿Qué análisis deben realizarse al agua para conocer si es apta o no para consumo humano?

R) Dichos análisis están divididos en dos grandes grupos, los análisis físicos químicos y los análisis microbiológicos.

5. Si al agua solo le efectúa un análisis físico-químico ¿Será suficiente para emitir un resultado sobre si es apta o no para consumo humano? ¿Por qué?


R) El que haya dos análisis no implica que al realizar alguno de los dos se pueda determinar su calidad pues el agua puede ser físico-química muy buena y microbiológicamente muy mala, y no puede ser usada para ningún tipo de consumo, ya que sería un vehículo de enfermedades patógenas, es decir, los dos tipos de análisis tienen que realizarse al mismo tiempo pues la decisión final para determinar si un agua es consumible o no, va a depender de los resultados arrojados por ambas pruebas.


6. En su opinión ¿Un Ingeniero Civil debe manejar el análisis microbiológico en el agua? ¿Por qué?

R) Se debe saber interpretar los resultados de ambas pruebas para la toma de decisiones, sin importar la rama a la cual esté dedicado, es por ello que tiene que dominar tanto los estudios físico-químicos como los microbiológicos. Por lo tanto resulta necesario que un Ingeniero Civil tenga conocimientos de dicho tema.

ANEXO D

- Validación de expertos

 UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA DE INGENIERÍA CIVIL
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA AMBIENTAL



Dadas las siguientes preguntas responder de manera precisa y objetiva:

1. ¿Cuáles son los objetivos que debe cumplir un Ingeniero Civil en materia de ambiente?
R)
2. ¿Qué papel juega el componente ambiental en el perfil de un Ingeniero Civil?
R)
3. ¿Qué importancia tienen los análisis para la determinación de la calidad del agua en la Ingeniería Civil?
R)
4. ¿Qué análisis deben realizarse al agua para conocer si es apta o no para consumo humano?
R)
5. Si al agua solo se efectúa un análisis físico-químico ¿Será suficiente para emitir un resultado sobre si es apta o no para consumo humano? ¿Por qué?
R)
6. En su opinión ¿Un Ingeniero Civil debe manejar el análisis microbiológico en el agua? ¿Por qué?
R)



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA DE INGENIERÍA CIVIL
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA AMBIENTAL



VALIDACIÓN DEL INSTRUMENTO

Solicitud de validación de contenido de los ítems que conforman el instrumento que se utilizará para obtener la información requerida en la investigación titulada: Manual de procedimientos para la toma de muestra, análisis e interpretación de los parámetros microbiológicos más relevantes existente en el agua para consumo humano, aplicable en el laboratorio de calidad ambiental de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Carabobo, realizado por las bachilleres Dorimar K., Herrera T., CI: 20.270.760 y Juset A., Pedroza C., CI: 22.001.279.

Objetivo General:

Elaborar un manual de procedimientos para la toma de muestra, análisis e interpretación de los parámetros microbiológicos existentes en el agua para consumo humano, el cual se utilizará en el laboratorio de Calidad Ambiental de la Facultad de Ingeniería Civil.

Objetivos Específicos:

1. Diagnosticar la necesidad de diseñar una manual para la toma de muestra, análisis e interpretación de los parámetros microbiológicos existentes en el agua para consumo humano, el cual se utilizará en el laboratorio de Calidad Ambiental de la Facultad de Ingeniería Civil.
2. Determinar la factibilidad técnica para un manual de procedimientos para la toma de muestra, análisis e interpretación de parámetros microbiológicos existentes en el agua para consumo humano, el cual se utilizará en el laboratorio de Calidad Ambiental de la Facultad de Ingeniería Civil.
3. Diseñar un manual de procedimientos para la toma de muestra, análisis e interpretación de parámetros microbiológicos existentes en el agua para consumo humano, el cual se utilizará en el laboratorio de Calidad Ambiental de la Facultad de Ingeniería Civil.

Validador:

Nombre y Apellido: Darwin López

Profesión: Ing Químico

**CUADRO DE VALIDACIÓN
JUICIO DE EXPERTOS**

A continuación, se presenta una serie de aspectos a considerar para validar los ítems que conforman parte del instrumento utilizado para diagnosticar la necesidad de diseñar una manual para la toma de muestra, análisis e interpretación de los parámetros microbiológicos existentes en el agua para consumo humano, el cual se utilizará en el laboratorio de Calidad Ambiental de la Facultad de Ingeniería Civil.

Se ofrecen dos (02) alternativas (Adecuado - Inadecuado) para que usted seleccione la que considere correcta y, al final realice las observaciones pertinentes en el espacio designado para ello.

Instrucciones:

- 1.- Lea cuidadosamente cada uno de los ítems que se presentan en cada instrumento.
- 2.- Para la toma de decisión, considere las siguientes observaciones:
 - Dos (02) adecuados se considera como dejar.
 - Uno (01) adecuados se considera como modificar.
 - Inadecuado se considera como quitar.

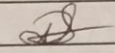
Criterios ítems	Coherencia con el objetivo de la investigación		Correspondencia de los ítems con lo que se desea determinar.		Redacción de los ítems		Presentación y longitud	
	Adec.	Inad.	Adec.	Inad.	Adec.	Inad.	Adec.	Inad.
1	X		X		X		X	
2	X		X		X		X	
3	X		X		X		X	
4	X		X		X		X	
5	X		X		X		X	
6	X		X		X		X	

OBSERVACIONES:

Validez

Aplicable	No aplicable	Aplicable a las observaciones de los expertos
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Fecha: 21/11/2016

Firma: 

C.I. N° 18.561.607



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA DE INGENIERÍA CIVIL
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA AMBIENTAL



VALIDACIÓN DEL INSTRUMENTO

Solicitud de validación de contenido de los ítems que conforman el instrumento que se utilizará para obtener la información requerida en la investigación titulada: Manual de procedimientos para la toma de muestra, análisis e interpretación de los parámetros microbiológicos más relevantes existente en el agua para consumo humano, aplicable en el laboratorio de calidad ambiental de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Carabobo, realizado por las bachilleres Dorimar K., Herrera T., CI: 20.270.760 y Juset A., Pedroza C., CI: 22.001.279.

Objetivo General:

Elaborar un manual de procedimientos para la toma de muestra, análisis e interpretación de los parámetros microbiológicos existentes en el agua para consumo humano, el cual se utilizará en el laboratorio de Calidad Ambiental de la Facultad de Ingeniería Civil.

Objetivos Específicos:

1. Diagnosticar la necesidad de diseñar una manual para la toma de muestra, análisis e interpretación de los parámetros microbiológicos existentes en el agua para consumo humano, el cual se utilizará en el laboratorio de Calidad Ambiental de la Facultad de Ingeniería Civil.
2. Determinar la factibilidad técnica para un manual de procedimientos para la toma de muestra, análisis e interpretación de parámetros microbiológicos existentes en el agua para consumo humano, el cual se utilizará en el laboratorio de Calidad Ambiental de la Facultad de Ingeniería Civil.
3. Diseñar un manual de procedimientos para la toma de muestra, análisis e interpretación de parámetros microbiológicos existentes en el agua para consumo humano, el cual se utilizará en el laboratorio de Calidad Ambiental de la Facultad de Ingeniería Civil.

Validador:

Nombre y Apellido:

Profesión:

Manph Jomey
Iny Civil

**CUADRO DE VALIDACIÓN
JUICIO DE EXPERTOS**

A continuación, se presenta una serie de aspectos a considerar para validar los ítems que conforman parte del instrumento utilizado para diagnosticar la necesidad de diseñar una manual para la toma de muestra, análisis e interpretación de los parámetros microbiológicos existentes en el agua para consumo humano, el cual se utilizará en el laboratorio de Calidad Ambiental de la Facultad de Ingeniería Civil.

Se ofrecen dos (02) alternativas (Adecuado - Inadecuado) para que usted seleccione la que considere correcta y, al final realice las observaciones pertinentes en el espacio designado para ello.

Instrucciones:

- 1.- Lea cuidadosamente cada uno de los ítems que se presentan en cada instrumento.
- 2.- Para la toma de decisión, considere las siguientes observaciones:
 - Dos (02) adecuados se considera como dejar.
 - Uno (01) adecuados se considera como modificar.
 - Inadecuado se considera como quitar.

Criterios	Coherencia con el objetivo de la investigación		Correspondencia de los ítems con lo que se desea determinar.		Redacción de los ítems		Presentación y longitud	
	Adec.	Inad.	Adec.	Inad.	Adec.	Inad.	Adec.	Inad.
1	x		x		x		x	
2	x		x		x		x	
3	x		x		x		x	
4	x		x		x		x	
5	x		x		x		x	
6	x		x		x		x	

OBSERVACIONES:

Validez

Aplicable	<input checked="" type="checkbox"/>	No aplicable	<input type="checkbox"/>	Aplicable a las observaciones de los expertos	<input type="checkbox"/>
-----------	-------------------------------------	--------------	--------------------------	---	--------------------------

Fecha: 18/11/2016

Firma: [Signature]

C.I. N° 13509120



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA DE INGENIERÍA CIVIL
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA AMBIENTAL



VALIDACIÓN DEL INSTRUMENTO

Solicitud de validación de contenido de los ítems que conforman el instrumento que se utilizará para obtener la información requerida en la investigación titulada: Manual de procedimientos para la toma de muestra, análisis e interpretación de los parámetros microbiológicos más relevantes existente en el agua para consumo humano, aplicable en el laboratorio de calidad ambiental de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Carabobo, realizado por las bachilleres Dorimar K., Herrera T., CI: 20.270.760 y Juset A., Pedroza C., CI: 22.001.279.

Objetivo General:

Elaborar un manual de procedimientos para la toma de muestra, análisis e interpretación de los parámetros microbiológicos existentes en el agua para consumo humano, el cual se utilizará en el laboratorio de Calidad Ambiental de la Facultad de Ingeniería Civil.

Objetivos Específicos:

1. Diagnosticar la necesidad de diseñar una manual para la toma de muestra, análisis e interpretación de los parámetros microbiológicos existentes en el agua para consumo humano, el cual se utilizará en el laboratorio de Calidad Ambiental de la Facultad de Ingeniería Civil.
2. Determinar la factibilidad técnica para un manual de procedimientos para la toma de muestra, análisis e interpretación de parámetros microbiológicos existentes en el agua para consumo humano, el cual se utilizará en el laboratorio de Calidad Ambiental de la Facultad de Ingeniería Civil.
3. Diseñar un manual de procedimientos para la toma de muestra, análisis e interpretación de parámetros microbiológicos existentes en el agua para consumo humano, el cual se utilizará en el laboratorio de Calidad Ambiental de la Facultad de Ingeniería Civil.

Validador:

Nombre y Apellido: Laura Albano

Profesión: Eng Civil

**CUADRO DE VALIDACIÓN
JUICIO DE EXPERTOS**

A continuación, se presenta una serie de aspectos a considerar para validar los ítems que conforman parte del instrumento utilizado para diagnosticar la necesidad de diseñar una manual para la toma de muestra, análisis e interpretación de los parámetros microbiológicos existentes en el agua para consumo humano, el cual se utilizará en el laboratorio de Calidad Ambiental de la Facultad de Ingeniería Civil.

Se ofrecen dos (02) alternativas (Adecuado - Inadecuado) para que usted seleccione la que considere correcta y, al final realice las observaciones pertinentes en el espacio designado para ello.

Instrucciones:

- 1.- Lea cuidadosamente cada uno de los ítems que se presentan en cada instrumento.
- 2.- Para la toma de decisión, considere las siguientes observaciones:
 - Dos (02) adecuados se considera como dejar.
 - Uno (01) adecuados se considera como modificar.
 - Inadecuado se considera como quitar.

Criterios ítems	Coherencia con el objetivo de la investigación		Correspondencia de los ítems con lo que se desea determinar.		Redacción de los ítems		Presentación y longitud	
	Adec.	Inad.	Adec.	Inad.	Adec.	Inad.	Adec.	Inad.
1	X		X		X		X	
2	X		X		X		X	
3	X		X		X		X	
4	X		X		X		X	
5	X		X		X		X	
6	X		X		X		X	

OBSERVACIONES:

Validez

Aplicable	No aplicable	Aplicable a las observaciones de los expertos
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Fecha: 28/11/2016

Firma: [Firma]

C.I. N° 13470475